

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

**PAPEL DE LOXL2 Y DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN bHLH E47
EN LA PROGRESIÓN TUMORAL Y LA METÁSTASIS**

GIACOMO CANESIN

Madrid, 2012

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**PAPEL DE LOXL2 Y DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN bHLH E47
EN LA PROGRESIÓN TUMORAL Y LA METÁSTASIS**

Giacomo Canesin

Licenciado en Ciencias Biomoleculares y Biofuncionales,
presenta esta memoria para optar al título de Doctor
por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de Tesis:

Dra. Amparo Cano García, Catedrática de la Universidad Autónoma de Madrid
Dr. Francisco Portillo Pérez, Catedrático de la Universidad Autónoma de Madrid

La presente tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica (Facultad de Medicina, UAM) y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid (CSIC-UAM), y financiada por una Beca de Formación del Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación

Madrid, 2012

Dra. Amparo Cano García

Catedrática de la Universidad Autónoma de Madrid

Dr. Francisco Portillo Pérez

Catedrático de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICAN que:

Giacomo Canesin, Licenciado en Ciencias Biomoleculares y Biofuncionales, ha realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina – Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM) de Madrid, el trabajo titulado “Estudio del papel del factor de transcripción bHLH E47 en la progresión tumoral”.

El presente trabajo cumple, a nuestro juicio, con los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como Tesis doctoral

Madrid,

Fdo. **Dra. Amparo Cano García**

Fdo. **Dr. Francisco Portillo Pérez**

A mi familia

A Curi

AGRADECIMIENTOS

Me acuerdo de cuando llegué a Madrid sin conocer a casi nadie: hace ya más de 4 años, y empezaba para mí una aventura inolvidable...ahora mirando hacia atrás, me doy cuenta de que todos los que han cruzado su camino con el mío han dejado una huella importante en mí....y por eso debería agradecer a mucha más gente de la que pongo aquí!!

Gracias a Amparo, por darme la posibilidad de trabajar en su grupo, por guiarme, ayudarme y corregirme. Ha sido un placer trabajar contigo, y gracias por todo lo que me has enseñado, también gracias a ti cada día me gusta más hacer ciencia. Gracias a Paco, por insultarme y llamarme mamón, porque sé que en realidad me tienes estima! y por enseñarme a mutar y a mutar y a mutar....

Me acuerdo que cuando entré al labo la primera vez, Amalia me guió por los cuartos de cultivos.....gracias Amalia por como me acogiste, y por enseñarme a echar “landas” en vez de microlitros!! Un gracias especial a Vanesa por su inestimable ayuda y su disponibilidad (por lo menos mitad de esta tesis la debo a ti!!), y a Saletina por todo el trabajo de los ratones, y sobre todo por no enfadarte cuando digo que estás como una perra!!! Gracias a Alfredo, por sus preguntas profundas y por dejarme “desvirgar” sus sacos de dormir! a Antonio por ser mi informador del “cuando cobramos?”, a Eva por los debates sobre los mutantes (transitan o no transitan???) y por dejarme los DVDs de Twilight!!! Fonchito, nunca olvidaré las horas pasadas hablando de ratones y de oligos, planeando experimentos y tú dándome consejos.....muchas gracias por tu paciencia y tu disponibilidad y por enseñarme palabras tan difíciles como “termo”!! Gracias a Fer, por sus consejos y por ser buen amigo, y a Ana por recordarme que hay que ser meticulosos y precisos al momento de hacer las cosas. Y gracias a Pablo, por ser tan buena persona y por hablar tan bajito (!!!), a Patricia por sus preciosos consejos, y a Gema que hasta ha sangrado para mirar mis H&E!!! Martuki, ha sido un placer conocerte, y compartir estos años en el labo (y fuera!) contigo, gracias por tu ayuda, los consejos, los momentos de enfado y de cabreo... simplemente, gracias por tu amistad!! Como me voy a olvidar del labo 1.12, con todos los cafés y comidas que hemos compartido!! y de Eva Cubillo, que me ha dejado una herencia importante...los bHLH...espero haber estado a la altura!!! y al mítico 1.9, mi labo de acogida, da cafés y galletas, de charlas, abrazos y muchos consejos.....graciasssssss!!!!

Samara, Simo&Lara....hemos compartido muchos momentos, y vuestra amistad ha sido un regalo desde el principio.....ahora nos separan muchos kilómetros, pero siempre os llevo conmigo, y sé que siempre estaréis allí. No puedo no mencionar mi grupo de baile, empezando

por Elena, que ha sido para mi una profesora de verdad, pero no solo de baile, sino de mucho más! Gracias por enseñarme algo todos los días y por ser mi amiga. Y gracias a todos mis compis... por las clases que hemos dado, lo que hemos aprendido juntos, las emociones de compartir escenario con todos vosotros... gracias!!!! os quiero mucho!! Elena&Paolo, nuestra amistad ha ido creciendo poco a poco, y la verdad es que cada día más me parece un regalo inestimable, gracias por estar ahí siempre que lo he necesitado, y espero que esto no cambie nunca!! Gracias a Mayte y Maria, por las actualizaciones de radio-patio-Puerta-de-Toledo, a Fran, Paoletta, Bea y Dani, Juan, Luis, Rocio, Annika, Iraida... por todos los buenos recuerdos que me trae el solo pensar en vosotros!!!

Grazie alla mia famiglia, ai miei genitori e a mio fratello, che mi hanno sempre incoraggiato in questo cammino. E a mia nonna, che ha sempre pregato per me, a lei va un ricordo speciale e una dedica particolare. Ovviamente ringrazio anche il resto del "parentame"...sapete che siete troppi per nominarvi uno a uno!! Vi ringrazio soprattutto per il bene che mi volete...e anche per i pranzi che mi preparate quando torno a casa!!!! Ai tanti amici maceratesi, che ogni volta che torno mi accolgono come se non me ne fossi mai andato....Maria Letizia, Stefania, Elvira, Letizia, Deborah, Yelena, Michela e tutto "El Duende"...grazie per la vostra amicizia!!! e a Marta, Lucia, Givi...anche se ci vediamo poco vi penso sempre!!!

Y por ultimo, gracias a Alex, por estar a mi lado y soportarme en este periodo "pre-tesico" tan duro... gracias porque cuando llego a casa cansado me abrazas y yo soy feliz, me cuentas tu día, preparas la cena conmigo y yo soy feliz... porque sabes escucharme, comprenderme y ayudarme... simplemente gracias por hacerme feliz!

RESUMEN

La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso complejo por el que las células epiteliales pierden su fenotipo epitelial polarizado para adquirir un fenotipo mesenquimático. La TEM se considera un evento esencial para la progresión de carcinoma *in situ* a carcinoma invasivo, ya que este proceso se acompaña a la adquisición de un fenotipo migratorio que confiere a las células la capacidad de invadir los tejidos adyacentes. La represión de *cadherina-E* se considera un evento clave de la TEM. En los últimos años se han caracterizado varios factores de transcripción que reprimen el promotor de *cadherina-E* (conocidos como EMT-TFs), entre los que se encuentran miembros de la familia Snail (Snail1/Snail2), de la familia bHLH (E12/E47; E2-2; Twist1) y de la familia ZEB (ZEB1, ZEB2). En este trabajo hemos centrado nuestros estudios en la función del factor bHLH E47, codificado por el gen *E2A* (también conocido como *TCF3* o *Tcfe2a*), y en su relación con la proteína LOXL2 (Lisil Oxidasa-like de tipo 2). Trabajos anteriores de nuestro laboratorio demostraron que el factor bHLH E47 está implicado en la represión de *cadherina-E* a nivel transcripcional, y en la inducción de TEM. Nuestro grupo también caracterizó a LOXL2 como un regulador de Snail1, inductor de TEM y como marcador de mal pronóstico en carcinomas de células escamosas de laringe, y más recientemente describió la asociación de LOXL2 con carcinomas basales de mama metastásicos. Los objetivos del presente trabajo se han centrado en analizar el papel de E47 *in vivo*, así como en la caracterización de la colaboración funcional entre E47 y LOXL2. Para estudiar la implicación del gen *E2A* en el proceso de carcinogénesis utilizamos un modelo de ratón *knock-out* condicional (KO-*E2A*) en epidermis, que se sometió al protocolo de carcinogénesis química en dos estadios (DMBA/TPA). Los resultados obtenidos evidencian por primera vez un papel dual del gen *E2A* en la iniciación y progresión tumoral: la delección de *E2A* inhibe el desarrollo de lesiones en la piel de ratones tratados con DMBA/TPA, mientras que favorece la progresión de dichas lesiones hacia carcinomas escamosos.

En relación con la regulación de E47, análisis previos del laboratorio de doble híbrido identificaron a LOXL2 como un potencial factor de interacción con E47. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran por primera vez la interacción *in vitro* e *in vivo* entre E47 y LOXL2, e indican que estas dos proteínas colocalizan en la zona perinuclear de la célula y colaboran en la represión del promotor de *cadherina-E* y del gen de polaridad *Lgl2*.

Finalmente, decidimos estudiar el posible papel de E47 y LOXL2 en la formación del nicho pre-metastásico utilizando para ello un modelo celular de adenocarcinoma de mama de ratón (línea celular Eo771). Nuestros datos demuestran que LOXL2 y E47 juegan un papel importante en la generación de la metástasis pulmonar, y contribuyen a la formación del nicho pre-metastásico, regulando el reclutamiento de células precursoras hematopoyéticas (HPCs) al pulmón, e induciendo la secreción de ciertas citoquinas y de fibronectina.

ABSTRACT

Epithelial–mesenchymal transition (EMT) is an intricate process by which epithelial cells lose their epithelial characteristics and acquire a mesenchymal-like phenotype. EMT has been established as a key event for dissociation of carcinoma cells from the primary tumours, concomitant to the acquisition of cell migration, which provides tumour cells with the ability to invade into the adjacent tissues. Down-regulation of *E-cadherin* is considered a hallmark of EMT. Several transcription factors have been described during the past decade as EMT inducers (presently known as core EMT-TFs), including members of the Snail (Snail1/2), bHLH (E12/E47, E2-2, Twist) and ZEB (ZEB1/2) families. In the present work, we have focused on E47, a bHLH transcription factor encoded by the *E2A* gene (also known as *TCF3* or *Tcfe2a*) and its relation to LOXL2. Previous studies from our group described a role for the bHLH transcription factor E47 as a repressor of *E-cadherin* expression and as an inducer of EMT. Our group also characterized lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), a member of the lysyl oxidase (LOX) family, as a regulator of Snail1, EMT inducer and as a poor prognostic marker of larynx squamous cell carcinoma, and its association to metastatic basal breast carcinomas.

The aims of the present work were to investigate the role of E47 in *in vivo* tumorigenesis, and to characterize the functional collaboration between E47 and LOXL2. First, in order to understand the role of E47 in tumorigenesis we used a conditional *E2A*-knock out model (*E2A* KO) in which *E2A*flox deletion in the epidermis was driven by Tamoxifen-Induced Cre activation under the specific K14 promoter region. This model was then subjected to the mouse skin carcinogenesis two-stage protocol using DMBA/TPA. Our data show for the first time a dual role for *E2A* in tumor initiation and progression, indicating that *E2A* deletion inhibits the development of skin lesions, but triggers the progression of benign papillomas to squamous cell carcinomas.

In the search for E47 regulators, a previous two hybrid screen identified LOXL2 as a potential partner. The results obtained in the present thesis demonstrate for the first time that E47 and LOXL2 interact *in vivo* and *in vitro* and co-localize in the cellular perinuclear region. Furthermore, LOXL2 functionally collaborates with E47 in the repression of the promoters of *E-cadherin* and *Lgl2*.

Finally, the possible role for both E47 and LOXL2 in the formation of the pre-metastatic niche was studied using a cell model of mouse breast carcinoma (Eo771 cells). We found that both LOXL2 and E47 play an important role in the generation of lung metastasis, contributing to the formation of the pre-metastatic niche by regulating the recruitment of Hematopoietic Progenitor Cells (HPCs) to the lungs and by modulating the secretion of certain cytokines and of fibronectin.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	5
1. La transición epitelio-mesénquima.....	7
2. Adhesión celular mediada por cadherina-E.....	8
2.1. Estructura del promotor de cadherina-E.....	9
2.2. Represores transcripcionales del gen CDH1.....	10
3. La Superfamilia de proteínas HLH.....	11
4. Las proteínas E2A (E12/E47).....	12
4.1. Papel de las proteínas E2A en la TEM.....	13
4.2. Ratones mutantes “knock out” condicionales del gen E2A.....	14
5. Modelo de carcinogénesis química de piel de ratón.....	15
5.1. La piel: estructura y función.....	15
5.2. Carcinogénesis química: iniciación, promoción y progresión.....	17
6. La familia de las Lisil Oxidasas.....	18
6.1. Estructura y función de las Lisil Oxidasas.....	18
6.2. Las Lisil Oxidasas en fisiología y en la progresión tumoral.....	19
6.3. La Lisil Oxidasa-like 2 (LOXL2): papel en la TEM y en la progresión tumoral.....	21
7. La metástasis y el nicho pre-metastásico.....	23
OBJETIVOS.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
1. Plásmidos de DNA.....	33
1.1. Vectores de expresión.....	33
1.2. Vectores mutantes generados.....	34
1.3. Vectores reporteros.....	35
2. Líneas celulares y cultivos celulares.....	36
3. Transfecciones.....	36
3.1. Transfecciones transitorias.....	37
3.2. Silenciamiento mediante interferencia génica.....	37
3.2.1. Generación de lentivirus.....	38
3.2.2. Infección lentiviral.....	38
4. Ensayo de actividad promotora.....	38
5. Análisis de RNA mensajero.....	39
5.1. Extracción de RNA total y síntesis de cDNA.....	39
5.2. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR.....	39

5.3. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real (qPCR).....	40
6. Anticuerpos.....	41
7. Análisis de proteínas en cultivos celulares.....	44
7.1. Obtención de extractos totales.....	44
7.2. Inmunoprecipitación de proteínas.....	44
7.3. Ensayo de pull-down.....	45
7.4. Análisis de proteínas mediante western blot.....	45
7.5. Análisis de inmunofluorescencia y microscopia confocal.....	46
8. Estudios <i>in vivo</i>	46
8.1. Modelos animales utilizados.....	46
8.1.1. Ratón KO condicional del gen <i>E2A</i>	46
8.1.2. Ratones C57BL/6J.....	47
8.1.3. Ratones EGFP-C57BL/6J.....	48
8.2. Genotipado de ratones KO condicionales de <i>E2A</i>	48
8.3. Tratamiento con 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT).....	50
8.4. Carcinogénesis química en piel.....	50
8.5. Ensayo de tumorigenicidad en la glándula mamaria y metástasis espontánea.....	50
8.6. Ensayo de metástasis experimental.....	51
8.7. Ensayo de trasplante de médula ósea.....	51
8.8. Análisis de citometría de flujo de muestras de pulmón y de sangre.....	51
9. Procesamiento de muestras de tejidos.....	52
9.1. Generación de bloques de parafina.....	52
9.2. Generación de bloques de OCT.....	52
10. Inmunofluorescencia de tejidos.....	52
11. Tinción con Hematoxilina/Eosina (H&E).....	53
12. Análisis estadísticos.....	53
RESULTADOS.....	55
1. Función del gen <i>E2A</i> en la carcinogénesis de piel de ratón.....	57
1.1. Efecto de la delección de <i>E2A</i> en la carcinogénesis química de piel de ratón.....	58
1.2. Análisis histológico de las lesiones generadas.....	62
2. Caracterización de la interacción entre E47 y LOXL2.....	62
2.1. LOXL2 interacciona con E47 <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	62
2.2. LOXL2 y E47 colocalizan en la zona perinuclear.....	64
2.3. Cooperación funcional entre E47 y LOXL2.....	65
3. Estudio de la implicación de E47 y LOXL2 en la formación y regulación del nicho pre-metastásico.....	69

3.1. Silenciamiento de E47 y LOXL2 en la línea celular Eo771.....	70
3.2. Efecto del silenciamiento de E47 y LOXL2 sobre el crecimiento del tumor primario y el desarrollo de metástasis.....	74
3.3. Estudio del papel de E47 y LOXL2 en la regulación del nicho pre-metastásico.....	78
3.3.1. Efecto del silenciamiento de E47 y LOXL2 sobre el reclutamiento de poblaciones celulares de médula ósea.....	78
3.3.2. Análisis de la infiltración pulmonar de células de la médula ósea.....	82
3.3.3. Estudio de expresión de factores implicados en la formación del nicho metastásico.....	84
3.3.3.1. Implicación de E47 y LOXL2 en la expresión de fibronectina y miembros de la familia LOX en el nicho pre-metastásico.....	84
3.3.3.2. Implicación de E47 y LOXL2 en la expresión de factores de crecimiento y citoquinas implicadas en el nicho pre-metastásico.....	89
DISCUSIÓN.....	93
1. Función del gen <i>E2A</i> en la carcinogénesis química de piel de ratón.....	95
2. Interacción y cooperación funcional entre E47 y LOXL2.....	99
3. Papel de LOXL2 y E47 en la regulación del nicho pre-metastásico.....	102
3.1. Efecto del silenciamiento de LOXL2 y E47 sobre el crecimiento del tumor primario y el desarrollo de metástasis de células Eo771.....	102
3.2. Papel de LOXL2 y E47 en el reclutamiento de células precursoras de la médula ósea y en la formación del nicho pre-metastásico.....	105
3.3. Efecto del silenciamiento de LOXL2 y E47 en la expresión de factores de la matriz extracelular implicados en la formación del nicho metastásico.....	107
CONCLUSIONES.....	111
CONCLUSIONS.....	115
BIBLIOGRAFÍA.....	119

ABREVIATURAS

AD1 dominio de transactivación 1 de factores E2A

AD2 dominio de transactivación 2 de factores E2A

ANG-1 angiopoietina-1

bHLH motivo básico Hélice-lazo-Hélice

BMDC células derivadas de la médula ósea (*Bone Marrow Derived Cells*)

BSA Albúmina bovina sérica

CDH1 gen que codifica para cadherina-E

CK citoqueratina

DAPI 4´6-Diamidin-2-Phenil Indol

DNA Ácido desoxirribonucleico

cDNA Ácido desoxirribonucleico complementario

DMBA 7,12-dimethylbenz[a]antraceno

DMEM Medio Eagle modificado por Dulbecco

ECL quimioluminiscencia aumentada

ECM Matriz extracelular

EDTA Ácido etilen-diamino tetracético

EGFP Proteína verde fluorescente potenciada

EPC células precursoras endoteliales (*Endothelial Precursor Cells*)

FITC Isotiocianato de fluoresceína

GAPDH gliceralheido-3-fosfato deshidrogenasa

GM-CSF factor de estimulación de colonias de granulocitos y monocitos (*Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor*)

GST glutation S-transferasa

HDAC histona deacetilasas

HIF1 factor de inducción de hipoxia-1

HPC células progenitoras hematopoyéticas (*Hematopoyetic Progenitor Cells*)

HRP peroxidasa de rábano

Id factores de inhibición de la diferenciación

IL interleuquina

KLF8 factor Kruppel-like 8

LOX lisil oxidasa

LOXL1-4 proteína similar a la lisil oxidasa tipo 1-4

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

MDCK: células derivadas del epitelio simple de riñón de perro (*Madin-Darby Canine Kidney*)

MMP metaloproteasa de matriz

NES secuencia de exportación nuclear

NMuMG células derivadas de glándula mamaria normal de ratón (*Normal Murine Mammary Gland*)

OCT temperatura optima de corte

4-OHT 4-hidroxi-tamoxifeno

PBS Tampón salino fosfato

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PFA paraformaldehído

p.i. post-inyección

PIGF factor de crecimiento de la placenta

PMSF Fluoruro de Phenilmetil-sulfonilo

PTHrP Peptido relacionado con la hormona paratiroidea (*Parathyroid hormone-related protein*)

qPCR Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

r.p.m. Revoluciones por minuto

RT Reacción transcriptasa inversa

SCC carcinoma de células escamosas (*Squamous Cell Carcinomas*)

SDS Dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

shRNA RNA de interferencia con forma de horquilla

SpCC carcinoma de células fusiformes (*Spindle Cell Carcinomas*)

SrcR dominio *scavenger* rico en cisteínas (*Scavenger Receptor Cystein Rich*)

TEM transición epitelio-mesénquima

TEN-C tenascina-C

TGFβ factor de transformación del crecimiento β

TIMP inhibidor tisular de metaloproteasa

TME transición mesénquima-epitelio

TNFα factor de necrosis tumoral α

TPA ester de forbol, 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato

VEGFR receptor para el factor de crecimiento del endotelio vascular

INTRODUCCIÓN

1. LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA

La transición epitelio mesénquima (TEM) es un proceso mediante el cual las células epiteliales pierden su fenotipo epitelial polarizado para adquirir un fenotipo mesenquimático o fibroblastoide con capacidad migratoria. Durante la TEM, las células epiteliales sufren la pérdida funcional de proteínas de adhesión célula-célula (como *cadherina-E*, componentes de uniones desmosomales y uniones estrechas) y otros marcadores epiteliales, pasando a expresar marcadores mesenquimáticos (como fibronectina y vimentina, entre otros). Como consecuencia del proceso de TEM, la célula sufre también una reorganización del citoesqueleto celular, que favorece su capacidad mótil e invasiva (Figura 1).

La TEM tiene un papel esencial durante la embriogénesis, donde células de las diferentes capas embrionarias migran para generar nuevos tejidos: los procesos de TEM son necesarios, por ejemplo, para la gastrulación y la formación del endodermo parietal, así como para la migración de las células de la cresta neural y la formación de una gran variedad de órganos y tejidos como el corazón, el sistema músculo-esquelético y el sistema nervioso periférico (Shook and Keller, 2003; Thiery and Sleeman, 2006; Thiery et al., 2009). Además de la función biológica durante la embriogénesis, los procesos de TEM también se producen en organismos adultos, participando en la patogénesis de enfermedades como la fibrosis renal o pulmonar (Kalluri and Neilson, 2003; Zeisberg and Kalluri, 2004; Willis et al., 2006) y la progresión tumoral (Thiery, 2002; Thiery and Sleeman, 2006; Thiery et al, 2009).

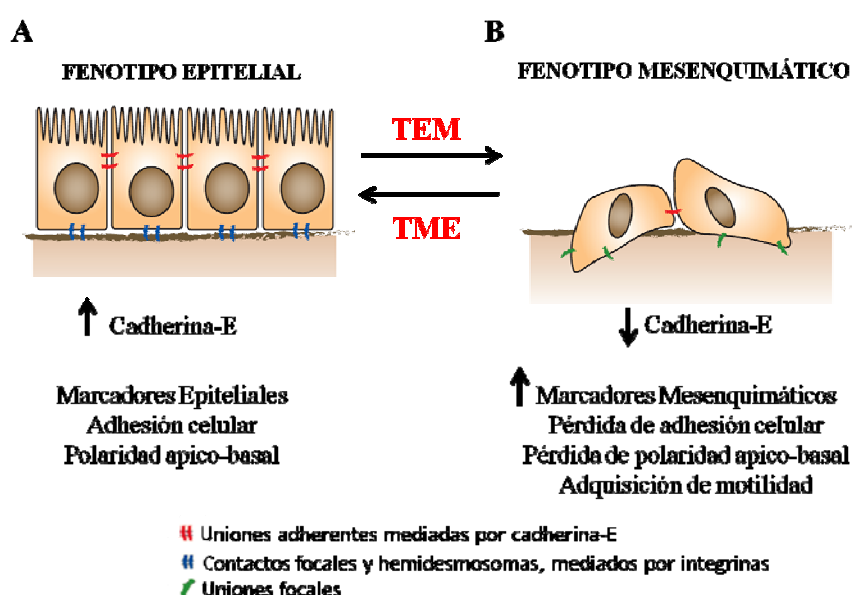


FIGURA 1: Representación esquemática de los principales eventos asociados a la transición epitelio-mesénquima (TEM). En el panel **A**) se representan las células de un epitelio simple, que expresan cadherina-E y otros marcadores epiteliales, lo que confiere adhesión celular y polaridad apico-basal. En el panel **B**) se representan células fusiformes que han sufrido una transición epitelio-mesénquima: este proceso se caracteriza por la pérdida de expresión de cadherina-E y la inducción de marcadores mesenquimáticos, la pérdida de adhesión celular y de polaridad apico-basal y la adquisición de motilidad celular. Modificado de Alberts et al (1996).

En el contexto de la tumorigénesis, la TEM ha sido implicada en el proceso de progresión tumoral de carcinoma *in situ* a carcinoma invasivo, debido a que el proceso de invasión tumoral va frecuentemente acompañado de cambios desde un fenotipo epitelial polarizado a un fenotipo migratorio e invasivo (Figura 1).

No obstante, hay que destacar que actualmente se considera la TEM como un proceso transitorio durante la progresión tumoral y el proceso de metástasis, siendo las células tumorales capaces de recuperar su fenotipo epitelial al establecerse como focos metastáticos en un tejido lejano, lo que implica un proceso inverso de transición mesénquima-epitelio (TME) (Figura 1) (Thiery, 2002; Thiery and Sleeman, 2006; Peinado et al., 2007; Polyak and Weinberg, 2009). La existencia de procesos transitorios de TEM-TME también se ha planteado en otras etapas de la metástasis (Peinado et al., 2007; Polyak and Weinberg, 2009), planteándose actualmente la existencia de estadios intermedios entre ambos procesos (Nieto and Cano, 2012).

2. ADHESIÓN CELULAR MEDIADA POR CADHERINA-E

En la última década se ha avanzado notablemente en la caracterización de los procesos moleculares que tienen lugar durante la TEM, identificándose algunas de las moléculas críticas para este proceso. La *cadherina-E* es una de las moléculas claves en el proceso de TEM, ya que el proceso implica en primer término la pérdida funcional de *cadherina-E* y conlleva la pérdida de otras proteínas de adhesión célula-célula (Thiery, 2002; Peinado et al., 2004a; Peinado et al., 2007). Diferentes estudios han puesto de manifiesto que la pérdida de expresión y/o función de *cadherina-E* correlaciona con una menor diferenciación y un mayor grado de progresión en diferentes tipos de carcinomas (revisado en Takeichi, 1993; Hajra and Fearon, 2002). Además, estudios con animales transgénicos han permitido establecer una relación de causalidad entre la pérdida funcional de *cadherina-E* y la transición de adenoma a carcinoma invasivo (Perl et al., 1998). Durante la última década se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de la regulación transcripcional del gen de *cadherina-E* (CDH1), especialmente a nivel de represión, habiéndose caracterizado varios factores de transcripción implicados en la represión del promotor de *cadherina-E* (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Comjin et al., 2001; Pérez-Moreno et al., 2001; Hajra et al., 2002; Bolós et al., 2003; Yang et al., 2004; Eger et al., 2005; Sobrado et al., 2009; Thiery et al., 2009; revisado en Peinado et al., 2007;).

2.1 Estructura del promotor de *cadherina-E*

El promotor de *cadherina-E* de ratón presenta varios elementos reguladores, entre los que se encuentran una caja CAAT, un elemento palindrómico denominado E-pal, y una región rica en GC (Figura 2A). La región rica en GC y la caja CCAAT han sido implicadas en la regulación basal de la actividad de este promotor (Behrens et al., 1991; Faraldo et al., 1997). El elemento palindrómico E-pal (-90/-70 con respecto al inicio de la transcripción) está constituido por dos cajas-E adyacentes, E1 (CAGGTG) y E2 (CACCTG), flanqueadas por cuatro nucleótidos invertidos (Behrens et al., 1991) (Figura 2B) y fue inicialmente descrito como un regulador positivo específico de tejido epitelial (Behrens et al., 1991), aunque posteriormente se caracterizó como un elemento de regulación negativa (Henning et al., 1996; Faraldo et al., 1997; Rodrigo et al., 1999). Existe también una caja E adicional (caja-E3) próxima al inicio de transcripción (-30) e implicada en represión transcripcional (Behrens et al., 1991), y una región CE próxima al elemento E-pal, con función de regulación negativa (Rodrigo et al., 1999). Estudios comparativos de los promotores de *cadherina-E* murino, humano y canino mostraron que la caja CAAT y la región rica en GC están conservadas en la misma posición (Comijn et al., 2001). Asimismo, también están conservadas en los promotores humano y canino las posiciones de las cajas E1 y E3 del promotor murino, mientras que la caja-E2 del promotor murino no existe en el promotor de humano y de perro. Adicionalmente, los promotores humano y canino poseen una caja-E4 después del inicio de transcripción que participa parcialmente en la represión del gen por algunos factores (Batlle et al., 2000; Hajra et al., 2002) (Figura 2B).

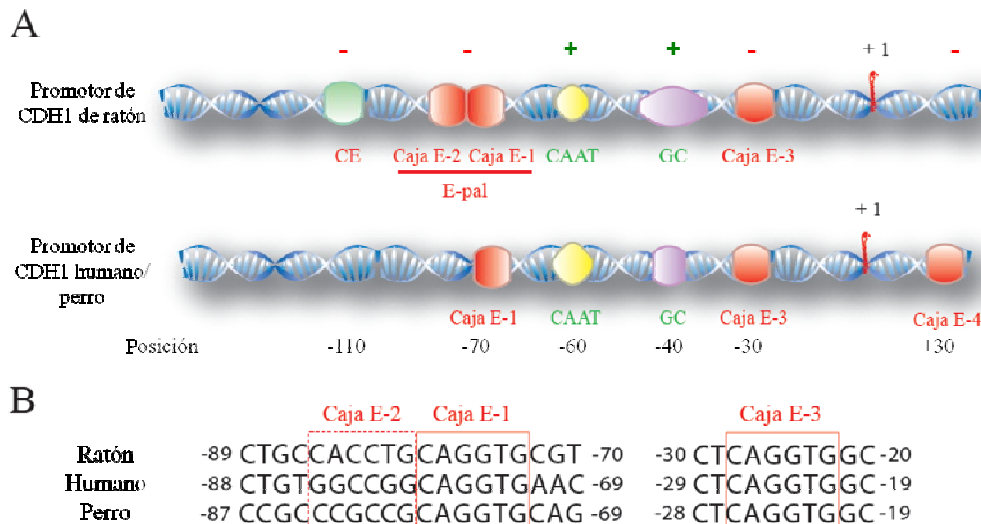


FIGURA 2: Elementos reguladores en el promotor proximal de *cadherina-E*. **A)** Representación esquemática del promotor proximal de *cadherina-E* de ratón, perro y humano. Se indican elementos reguladores positivos (caja CAAT y región GC) y negativos (cajas E, región CE). La caja CAAT, la región rica en GC y las cajas E1 y E3 se encuentran conservadas en los tres promotores, mientras que la caja E2 y el elemento CE son exclusivos del promotor de ratón. Los promotores humano y canino poseen además una caja E4. En el promotor de ratón, las cajas E1 y E2 están adyacentes y constituyen el elemento palindrómico E-pal. **B)** Secuencias de las cajas E del promotor proximal de *cadherina-E* de ratón, canino y humano. La conservación de las cajas E1 y E3 en las tres especies se indica con los recuadros en línea continua; la caja E2 en el promotor de ratón se indica mediante línea discontinua. Adaptado de Peinado et al. (2004a).

2.2 Represores transcripcionales del gen CDH1

En los últimos años se han caracterizado varios factores de transcripción que reprimen el promotor de *cadherina-E* a través de la interacción con las cajas-E o bien de forma indirecta. Entre estos se encuentran factores de dedos de zinc de las familias Snail (Snail1, Snail2) y Zeb (ZEB1, ZEB2) (Battle et al., 2000; Cano et al., 2000; Grooteclaes and Frisch 2000; Comijn et al., 2001; Hajra and Fearon., 2002; Bolós et al., 2003), factores bHLH como E47, E2-2 y Twist1 (Pérez-Moreno et al., 2001; Yang et al., 2004; Sobrado et al., 2009;) y otros factores de mas reciente descubrimiento como el Factor Kruppel-like 8 (KLF8), Goosecoid o FoxC2 (Hartwell et al., 2006; Wang et al., 2007; Mani et al., 2007; revisado en Peinado et al., 2007; revisado en Nieto MA, 2009).







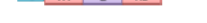
La caracterización de Snail1 como represor de *cadherina-E* confirmó que la represión del promotor murino se produce a través del elemento E-pal (Cano et al., 2000), al igual que sucede con E47 (Pérez-Moreno et al., 2001) y con Snail2 (Bolós et al., 2003), mientras que en el promotor humano la represión de Snail1 y Snail2 depende de las 3 cajas E (Battle et al., 2000; Hajra and Fearon, 2002). Por otra parte, también KLF8 ejerce su actividad represora uniéndose directamente al promotor de *cadherina-E* (Wang et al., 2007), mientras que otros factores como Goosecoid y E2-2 parecen actuar mediante mecanismos indirectos sobre el promotor de *cadherina-E* (Hartwell et al., 2006; Sobrado et al., 2009), o bien reprimiendo a nivel post-transcripcional como FoxC2 (Mani et al., 2007). En cambio, los mecanismos de represión de Twist1 (Yang et al., 2004) son todavía controvertidos, existiendo datos que apoyan una represión directa sobre el promotor de *cadherina-E* por cooperación con otros factores como Bmi1 (Yang et al., 2010) mientras que otros autores apoyan mecanismos indirectos (Ma et al., 2007; Casas et al, 2011).

Significativamente, todos los factores descritos mas allá de reprimir la expresión de *cadherina-E* actúan como inductores de TEM: la expresión estable de cualquiera de estos factores en células epiteliales produce un proceso de TEM completa y la adquisición *in vitro* e *in vivo* de un fenotipo invasivo y migratorio (revisado en Peinado et al., 2007; revisado en Moreno-Bueno et al., 2008, revisado en Thiery et al., 2009; revisado en Nieto MA, 2011). Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que la TEM inducida por la expresión estable de Snail1, Snail2, E47 o E2-2 en células epiteliales está asociada a la puesta en marcha de programas genéticos comunes pero también específicos (Moreno-Bueno et al., 2006; Sobrado et al., 2009) y la adquisición de propiedades invasivas diferenciales (Peinado et al., 2004a; Sobrado et al., 2009), apoyando un papel diferencial para estos factores en la progresión y la invasión tumoral.

3. LA SUPERFAMILIA DE PROTEÍNAS HLH

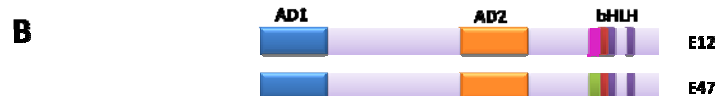
Las proteínas HLH son reguladores transcripcionales que desempeñan importantes funciones en muchos procesos esenciales del desarrollo, regulando el crecimiento celular y la diferenciación de diferentes tipos celulares (revisado en Massari and Murre, 2000; Jones, 2004). Los miembros de esta superfamilia se caracterizan por la presencia de un dominio hélice-lazo-hélice (HLH), constituido por dos α -hélices anfipáticas, separadas por una región flexible, no helicoidal (lazo). A través de este dominio, las proteínas HLH homo- o hetero-dimerizan, lo cual es esencial para su función reguladora de la transcripción (Murre et al., 1989). Adicionalmente, la mayoría de las proteínas HLH poseen una región básica, N-terminal al motivo HLH, que media la unión al DNA (Davis et al., 1990; Voronova and Baltimore, 1990), dando lugar a lo que comúnmente se denomina dominio bHLH. Las secuencias más comunes de unión al DNA de los factores bHLH son las cajas E, presentes en los promotores de numerosos genes y formadas por la secuencia consenso de seis nucleótidos CANNTG, donde N puede ser cualquier nucleótido (Ephrussi et al., 1985; Lassar et al., 1989).

Existen más de 200 factores HLH, que se han clasificado en siete clases (I-VII) (Figura 3A) según su distribución tisular, su capacidad de dimerización y su unión específica al DNA (revisado en Massari and Murre, 2000; Jones, 2004). Los más abundantes son los factores pertenecientes a las clases I, II y V. La clase I está constituida por seis proteínas, también conocidas como proteínas E (revisado en Massari and Murre, 2000) y codificadas por 3 genes distintos: E2A (*TCF3*), E2-2 (*TCF4*) y HEB (*TCF12*), que en todos los casos dan lugar a dos isoformas por mecanismos alternativos de *splicing* (Murre et al., 1989; Zhang et al., 1991; Soosar et al., 1994). Las proteínas E se expresan en muchos tejidos, pero no son ubicuas y generalmente se unen al DNA formando heterodímeros con factores bHLH de clase II, aunque también son capaces de homo- o hetero-dimerizar entre sí (revisado en Massari and Murre, 2000). La clase II está constituida por factores con expresión específica de tejido, como los factores miogénicos MyoD (Weintraub et al., 1991), miogenina (Hasty et al., 1993), twist (Massari and Murre, 2000) o el factor NeuroD (Ma et al., 1996). La clase V está constituida por cuatro proteínas denominadas Id (Inhibidores de Diferenciación), que carecen de la región básica adyacente al dominio HLH, por lo que no son capaces de unirse al DNA (revisado en Massari and Murre, 2000). Por lo tanto, los factores de clase V se consideran como dominantes negativos, ya que pueden dimerizar con factores de clase I y II a través de su dominio HLH, pero el heterodímero formado es incapaz de unirse al DNA (Perk et al., 2005).

A Descripción esquemática de las diferentes clases de proteínas HLH			
Clasificación	Características	Ejemplos	Funciones
Clase I 	Amplia expresión; capaces de homó o heterodimerizar	E12/E47; E2-2A/B; HEB1/2 (proteínas E)	Unfogénesis, neurogénesis, miogénesis, etc.
Clase II 	Expresión específica de tejidos; suelen heterodimerizar con proteínas bHLH de clase	MyoD, NeuroD, Mash1, Twist, Tal1	Miogénesis, neurogénesis, hematopoyesis, etc.
Clase III 	Poseen un motivo cremallera de leucinas adyacente al dominio bHLH	Myc, MTF	Proliferación, diferenciación, apoptosis, melanogénesis, etc.
Clase IV 	Capaces de heterodimerizar con Myc o entre ellas	Max, Mxi1, Mad	Proliferación, apoptosis, etc.
Clase V 	Carecen del dominio básico de unión al DNA; actúan como dominantes negativos de proteínas bHLH de clases I y II	Factores Id	Proliferación, diferenciación, angiogenesis, etc.
Clase VI 	Poseen una prolina conservada en la región básica	HES, HES1	Ruta de señalización de Notch, proliferación, etc.
Clase VII 	Presentan un dominio PAS adyacente al dominio bHLH	HIF1α, AHR	Respuesta a hipoxia, a hidrocarburos aromáticos, etc.

H1-L-H2: dominio HLH (H: hélice 1, L: lazo, H2: hélice 2); b: región básica adyacente al dominio HLH; L2: cremallera de leucinas (leucine zipper); PAS: dominio PAS; Pro: prolina. Adaptado de Massari and Murre (2000).

FIGURA 3: A) Descripción esquemática de las diferentes clases de proteínas bHLH. Adaptado de Massari and Murre (2000). **B)** Representación esquemática de los principales dominios estructurales y funcionales de las proteínas E2A. Se indican los diferentes dominios: HLH: dominio hélice-lazo-hélice (morado); b: región básica de unión al DNA (rojo); AD1: dominio de transactivación 1 (azul); AD2: dominio de transactivación 2 (naranja). Se representa en fucsia la región específica de E12 y en verde la región específica de E47 adyacente al dominio básico. Adaptado de Woodcroft (2009).



4. LAS PROTEÍNAS E2A (E12/E47)

Las proteínas E2A incluyen dos isoformas, E12 y E47, que se generan por procesamiento (*splicing*) alternativo del mRNA codificado por el gen *TCF3* (también conocido como *Tcfe2a* y *E2A*). Estas proteínas poseen el dominio bHLH en la región carboxi-terminal (Murre et al., 1989); además presentan dos dominios de transactivación a través de los cuales reclutan los complejos coactivadores o corepresores: el dominio AD1 en la región amino-terminal, con capacidad de formar una estructura helicoidal, y el dominio AD2, rico en residuos de leucina (Aronheim et al., 1993; Massari et al., 1996) (Figura 3B). Por lo general, las proteínas E2A heterodimerizan con factores bHLH de clase II promoviendo activación transcripcional, como el complejo E47/MyoD, que participa en la activación de genes miogénicos (Berkes and Tapscott, 2005) o el complejo BETA2/NeuroD en la de genes neurogénicos (Bertrand et al., 2002). Sin embargo, estos factores también pueden actuar como represores transcripcionales, dependiendo de las proteínas bHLH con las que estén dimerizando (Lemerrier et al., 1998; Goardon et al., 2006). Por otra parte, las proteínas E2A pueden homodimerizar, actuando en este caso mayoritariamente como activadores transcripcionales de genes hematopoyéticos que contribuyen a la diferenciación de linfocitos B y T (Schlüssel et al., 1991; Shen et al., 1995). Con respecto al mecanismo de acción, las proteínas E2A ejercen su activación transcripcional

mediante el reclutamiento de proteínas con actividad acetil-transferasa de histonas (CBP, p300, PCAF) (Qiu et al., 1998; Bradney et al., 2003). Por otro lado, en la actividad represora ejercida por las proteínas E2A se ha implicado la familia de corepresores ETO (ETO, ETO2 y MTGR1), con capacidad de interaccionar con los corepresores N-CoR y Sin3A y de reclutar complejos de histona deacetilasas HDAC1 y HDAC3 (Wang et al., 1998; Zhang et al., 2004). No obstante, los mecanismos específicos de acción transcripcional de las proteínas E2A no son totalmente conocidos.

4.1 Papel de las proteínas E2A en la TEM

Trabajos anteriores de nuestro laboratorio demostraron que E47 está implicado en la represión de *cadherina-E* a nivel transcripcional, de forma dependiente de las cajas E del elemento E-pal del promotor de ratón (Pérez-Moreno et al., 2001; Bolós et al., 2003). La expresión constitutiva de E47 en las células de epitelio renal canino MDCK induce una TEM completa, asociada a la pérdida de expresión de *cadherina-E*, a la inducción de la expresión de marcadores mesenquimáticos y a la adquisición de propiedades migratorias e invasivas, así como tumorigénicas y angiogénicas (Pérez-Moreno et al., 2001; Peinado et al., 2004b). La expresión ectópica de las proteínas E2A también es capaz de inducir TEM en la línea celular de epitelio mamario de ratón NMuMG (Kondo et al., 2004). Las proteínas E2A también han sido implicadas en la TEM asociada a la fibrosis renal inducida por el inmunosupresor ciclosporina A (CsA) (Slattery et al., 2006); además, la sobreexpresión de E2A en células del epitelio renal proximal induce una TEM asociada a la pérdida de expresión de *cadherina-E*, a la inducción de la actina muscular del músculo liso (α -SMA) y a cambios en el citoesqueleto de actina, similar a la inducida por CsA (Slattery et al., 2008). Adicionalmente, se ha demostrado que el factor TGF β , un potente inductor de TEM en varios sistemas celulares (Thiery, 2002; Thiery and Sleeman, 2006), juega un papel esencial en la regulación de la función de las proteínas E2A como represores de *cadherina-E* e inductores de TEM en las células NMuMG (Kondo et al., 2004). Finalmente, se ha observado que la expresión de mRNA de *TCF3* se induce por hipoxia de manera dependiente de HIF1 en la TEM experimentada por las células de carcinoma renal de células claras (Krishnamachary et al., 2006). En trabajos anteriores de nuestro grupo, los análisis de expresión de E47 en líneas celulares tumorales murinas y humanas evidenciaron una mayor expresión en aquellas más invasivas y tumorigénicas de carcinomas y melanomas, asociada a un bajo nivel de expresión de *cadherina-E* y a un fenotipo típicamente mesenquimático (Pérez-Moreno et al., 2001). Además, estudios adicionales de nuestro grupo indican que E47 está sobreexpresado en carcinomas de mama de fenotipo basal (Cubillo et al., en preparación).

4.2 Ratones mutantes “knock out” condicionales del gen *E2A*

Las proteínas E2A juegan un papel fundamental en el desarrollo normal de las células B y T: de hecho, estas proteínas fueron inicialmente identificadas por su capacidad de unirse a las cajas E de las secuencias promotoras de las IgH e Igk (revisado en Kee, 2009). Aunque el correcto desarrollo de las células progenitoras hematopoyéticas a células B y T, y su maduración definitiva, requieran la actividad de una serie de factores de transcripción, las proteínas E2A parecen jugar un papel esencial, tanto que alteraciones en los niveles de expresión de estas proteínas se asocian al desarrollo de leucemias B y T (Nutt and Kee, 2007). La proteína E47 juega un papel fundamental en la diferenciación de las células B: los homodímeros de E47 son específicos de las células B (Shen et al., 1995) y son capaces de activar la reorganización de los genes de las inmunoglobulinas en las células B y T (Schlissel et al., 1991). Además, E47 ha sido también implicado directamente en la regulación transcripcional de varios genes específicos del linaje de las células B, y parece ser esencial para la recombinación de las cadenas H y L de las inmunoglobulinas (Bain et al., 1994; Kee and Murre, 1998; Greenbaum and Zhuang, 2002; Lazorchak et al., 2006). El papel relevante de las proteínas E2A en el desarrollo de las células del linaje linfóide, se ha puesto de manifiesto convincentemente en estudios con modelos murinos de delección de este gen. Estudios en ratones deficientes en E2A (“knockout” *E2A*) han demostrado que la falta de las proteínas E2A impide a las células B precursoras (células pro-B) completar su diferenciación y, además, que las células pro-B no son capaces de expresar una serie de proteínas asociadas al correcto desarrollo de las células B, como PAX5 o RAG1 (Murre, 2005; Hsu et al., 2003). En estos modelos, además, las células B no son capaces de llegar a la maduración completa, quedándose en estadios tempranos por la incapacidad de organizar correctamente las cadenas de las IgH (Bain et al., 1994; Zhuang et al., 2004) y las cadenas Igk (Lazorchak et al., 2006). En realidad, estudios más recientes han mostrado que existen funciones distintas para las isoformas E12 y E47 en el desarrollo de las células B: la delección de E47 bloquea el desarrollo de las células B en su estadio más temprano, mientras E12 parece ser indispensable para la especificación del linaje B y para la consecuente reorganización de las cadenas Igk e Igλ (Beck et al., 2009). Los ratones *E2A*^{-/-} y los ratones *E47*^{-/-}, además de ser incapaces de producir células B maduras, muestran también un desarrollo incorrecto de las células T, con un bloqueo parcial de estas células en su primer estadio de desarrollo (CD44⁺CD25⁻) y una hipocelularidad de la glándula tímica (Bain et al., 1994; Zhuang et al., 1994; Barndt and Zhuang, 1999). La importancia de las proteínas E2A en el desarrollo de las células T se ha evidenciado también en el hecho de que los ratones *E2A*^{-/-} desarrollan linfomas de células T entre los 3 y los 10 meses de edad, de la misma manera que los ratones deficientes en la isoforma *E47* (Bain et al., 1997;

Yan et al., 1997); además, estos ratones presentan anomalías en la proliferación de las células T y en la diferenciación linfoide (Yang et al., 2008). Estudios en ratones knock-out condicionales para *E2A*, en los que el gen *E2A* se encuentra delecionado específicamente en las células T, han demostrado no sólo que las proteínas E2A son esenciales para que las células T lleguen a su fase de maduración completa, sino que la falta de dichas proteínas induce una respuesta inmune alterada en dichos ratones (Pan et al., 2002).

5. MODELO DE CARCINOGENESIS QUÍMICA DE PIEL DE RATÓN

5.1 La piel: estructura y función

La piel es la barrera fisiológica que comunica y protege el organismo del ambiente externo. Está constituida por la hipodermis (tejido adiposo), la dermis (tejido conectivo) y la epidermis (epitelio estratificado) (Fuchs E, 1990).

La hipodermis es la capa más interna de la piel y une de manera laxa la dermis con los órganos adyacentes. Está compuesta por una capa variable de tejido adiposo, la cual ejerce de aislante evitando la pérdida de calor corporal y protegiendo el cuerpo contra traumatismos superficiales. La dermis es la capa intermedia, siendo el soporte físico de varias estructuras anatómicas como los vasos sanguíneos, vasos linfáticos, receptores sensoriales, folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas (estas últimas ausentes en la piel del ratón). La dermis está compuesta principalmente por matriz extracelular, constituida por colágenos fibrilares (tipo I y III), elastina, glicosaminoglicanos y glicoproteínas filamentosas. El principal tipo celular de la dermis es el fibroblasto, célula mesenquimática con una morfología fusiforme (Alberts et al., 1996). La epidermis es un epitelio renovable, estratificado y queratinizado, compuesto en su mayor parte por queratinocitos. Además contiene melanocitos (células productoras de melanina), células de Langerhans (macrófagos intraepidérmicos con función presentadora de antígenos) y células de Merkel (receptores sensoriales). Los queratinocitos se organizan en capas de células que representan estadios sucesivos en la diferenciación terminal de la epidermis. Se distinguen cuatro capas según su disposición y morfología: basal, espinosa, granular y cornificada (Figura 4) (Alberts et al, 1996). Las células de la capa basal mantienen la capacidad proliferativa y periódicamente ejecutan el programa de diferenciación terminal. La transición de la capa basal a la capa suprabasal superior es el paso principal del programa de diferenciación terminal. Cuando las células de la capa basal entran en la capa espinosa, dejan de expresar las citoqueratinas 5 y 14 (CK5 y CK14) para expresar las citoqueratinas CK1 y CK10 (Fuchs and Green, 1980). Posteriormente, migran a la capa granular, donde expresan proteínas estructurales características de la diferenciación

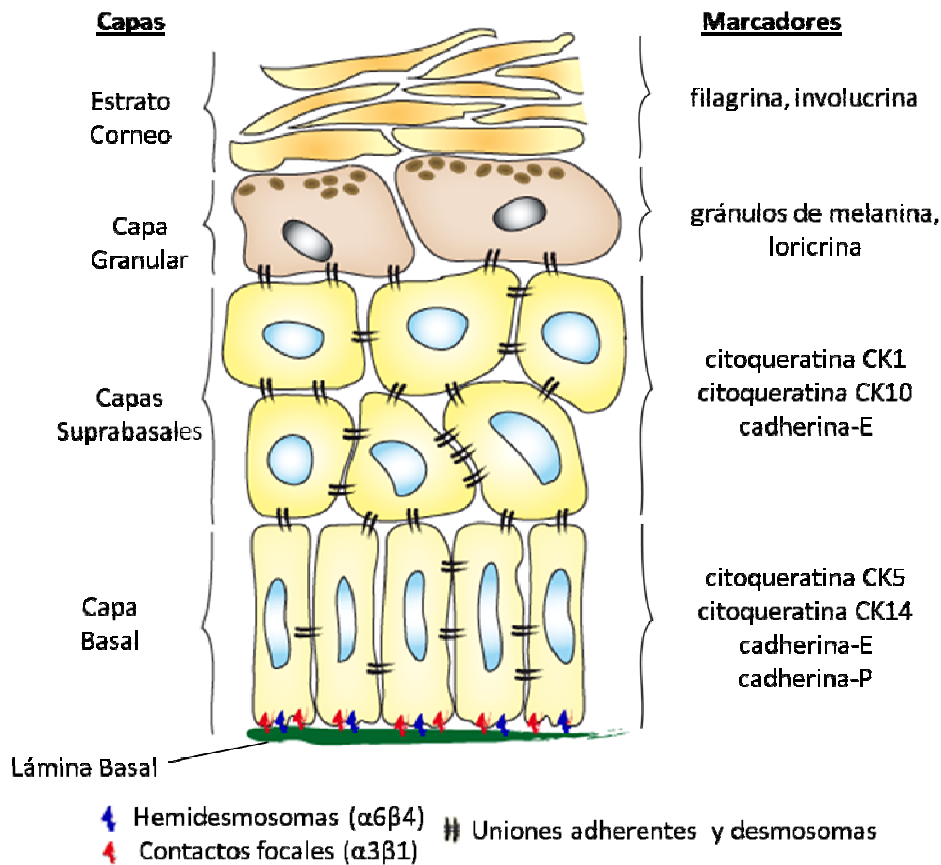
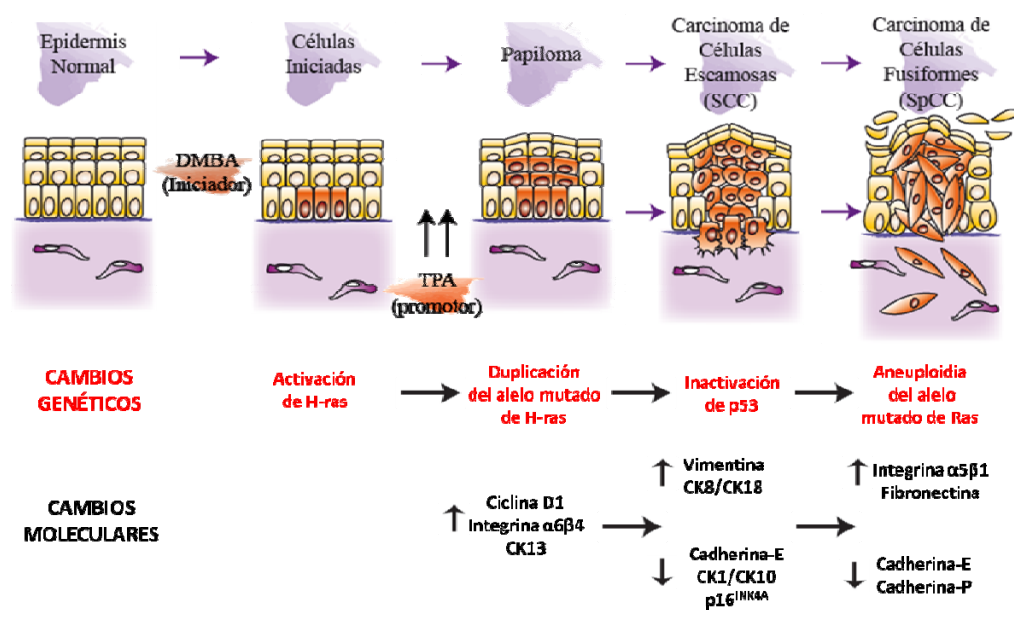


FIGURA 4:
Representación esquemática de la estructura de la epidermis. El esquema representa la organización de las distintas capas que componen la epidermis, así como las proteínas que se expresan mayoritariamente en cada una de las capas y sirven como marcadores específicos. La lámina basal (en verde) se incluye en este esquema aunque no forma parte de la epidermis, sino de la matriz, para indicar el contacto mediado por integrinas ($\alpha 3 \beta 1$ y $\alpha 6 \beta 4$) entre ésta y las células de la capa basal. Modificado de Alberts et al (1996).

terminal, como profilagrina y loricrina. Al mismo tiempo, se reprime completamente la síntesis de DNA, que culmina con la pérdida de los núcleos celulares y la expresión de marcadores como la involucrina. Finalmente, se produce la muerte del queratinocito en la capa cornificada desprendiéndose de la superficie de la epidermis (descamación) cuando son empujadas por las células de las capas inferiores (Fuchs, 1990). Es importante mencionar que las células de la capa basal y suprabasal expresan cadherina-E como el principal componente de adhesión intercelular, mientras que la expresión de cadherina-P se restringe a la capa basal, estando las capas suprabasales enriquecidas en desmosomas, en especial el estrato espinoso (Pérez-Moreno et al., 2003; revisado en Peinado et al., 2004b). Actualmente se considera que las células madre de la epidermis se localizan en una región específica del folículo piloso, denominada “bulge” (Blanpain and Fuchs, 2006). A partir de esta zona, las células madre se movilizan en respuesta a diferentes señales que promueven la activación de vías como Wnt- β -catenina, dando lugar a los progenitores que se localizan en la capa basal de la epidermis (también denominados “*transient amplifying cells*”) y que mantienen capacidad proliferativa restringida, y también a otros linajes de la epidermis (Watt et al., 2006; Blanpain and Fuchs, 2009; revisado en Ohshima M, 2006; revisado en Fuchs E, 2009).

5.2 Carcinogénesis química: iniciación, promoción y progresión

El modelo de carcinogénesis química de piel de ratón en dos estadios se basa en la utilización de un carcinógeno como iniciador y de un promotor tumoral para generar un proceso canceroso multisecuencial (Boutwell, 1974; Hennings and Yuspa, 1985; Yuspa et al., 1996). El protocolo consiste en la aplicación tópica de una dosis del carcinógeno químico dimetilbenzantraceno (DMBA), que actúa promoviendo la aparición en la epidermis de “células iniciadas” (células que han sufrido mutaciones en su DNA), seguida de aplicaciones repetidas del éster de forbol (TPA) como promotor tumoral, que induce la división descontrolada de las células de la epidermis generando inicialmente un proceso de hiperplasia (Figura 5). Con este protocolo, al cabo de varias semanas se generan tumores benignos (papilomas), la mayoría de los cuales regresan. Un pequeño número (5-10%) de los papilomas evolucionan a carcinomas escamosos malignos (SCC) que eventualmente progresan a carcinomas indiferenciados de tipo fusiforme (SpCC) (Stenbäck, 1980; Ewing et al 1988). Durante este proceso suceden cambios genéticos y epigenéticos que generan células iniciadas y favorecen la promoción y progresión maligna (Yuspa et al., 1994), de manera que se pueden distinguir tres etapas en la carcinogénesis química de piel de ratón: iniciación, promoción y progresión maligna. Así, la iniciación con el carcinógeno DMBA promueve la activación del oncogén Harvey-ras (H-ras) mediante la mutación específica del codón 61 del gen H-ras (Balmain et al., 1984; Brown et al., 1986; Quintanilla et al., 1986). Durante la promoción y la progresión de papilomas a SCCs se produce la amplificación del alelo mutado de H-ras, mientras que en los últimos estadios de la progresión maligna (SpCC) se produce la amplificación alélica de H-ras, acompañada de la pérdida del alelo normal (Bianchi et al., 1990; Brown and Balmain, 1995).



Asimismo, durante la progresión de papilomas a SCC se produce la inactivación del gen supresor de tumores p53 (Burns et al., 1991; Ruggeri et al., 1991) y de p19 Arf mediante procesos de regulación genética y epigenética (Kelly-Spratt et al., 2004) (Figura 5). Además de las alteraciones genéticas, durante el proceso de carcinogénesis tienen lugar cambios en los patrones de expresión de proteínas de diferenciación, habiéndose caracterizado varios marcadores que permiten clasificar las distintas lesiones generadas durante el proceso de carcinogénesis (Figura 5). Así, la epidermis hiperplásica y los papilomas incipientes expresan marcadores epiteliales y de diferenciación como cadherina-E y citoqueratina 10 (CK10). Los papilomas con alto riesgo de progresión expresan otros marcadores como la citoqueratina 13 (CK13) (Giménez-Conti et al., 1990; Nischt et al., 1988) y la integrina $\alpha 6 \beta 4$ (restringida a la capa basal en la epidermis normal) en las capas basal y suprabasal (Tennenbaum et al., 1992). La conversión de papiloma a carcinoma se asocia con cambios en los marcadores de diferenciación epitelial: disminuye la expresión de cadherina-E (Navarro et al., 1991) y de las citoqueratinas CK1 y CK10 (Roop et al., 1988) y se incrementa la expresión de integrina $\alpha 6 \beta 4$ (Gómez et al., 1992). Además, en las primeras etapas del proceso de progresión maligna se produce un aumento en la expresión de citoqueratinas embrionarias CK8 y CK18 (Larcher et al., 1992; Caulin et al., 1993;), mientras que en los estadios finales (carcinomas indiferenciados, SpCC) se induce la expresión de vimentina y fibronectina, características de células mesenquimáticas (Caulin et al., 1993; Gómez et al., 1994), la expresión de la integrina $\alpha 5 \beta 1$ (Gómez and Cano, 1995) y la pérdida completa de expresión de cadherina-E y cadherina-P (Navarro et al., 1991) (Figura 5).

6. LA FAMILIA DE LAS LISIL OXIDASAS

6.1 Estructura y función de las Lisil Oxidasas

Las lisil oxidasas son enzimas dependientes de cobre cuya función principal es catalizar las reacciones de desaminación oxidativa de grupos ϵ -amino presentes en residuos de lisina, promoviendo la formación de grupos ceto-aldehído que reaccionan entre sí, formando enlaces covalentes estables inter e intramoleculares en proteínas de la matriz extracelular, como colágeno y elastina (Csizar, 2001). Hasta la fecha han sido identificados 5 genes que codifican para distintos miembros de esta familia: el miembro fundador, “Lysyl oxidase” (LOX) que da nombre a la familia, y 4 miembros relacionados, “Lysyl Oxidase Like” 1-4 (LOXL1-4) (Molnar et al, 2003). A nivel estructural, todos los miembros de la familia LOX presentan un dominio catalítico muy conservado que se localiza en la región C-terminal: tres residuos de histidina de esta región (H292, H294 y H296 en el caso de LOX) son responsables de la unión al cobre y de

la actividad enzimática (López and Greenaway, 2011), en la que participa también un cofactor Lisil-Tirosil-Quinona (LTQ) como donador de electrones (Maki and Kivirikko, 2001; revisado en Lucero and Kagan, 2006). La región N-terminal está menos conservada y se caracteriza por la presencia de diferentes secuencias en los distintos miembros de la familia (Figura 6). La región amino terminal de LOX contiene una secuencia propeptido (PP) que se elimina tras la secreción, mientras que LOXL1 presenta una región rica en residuos de prolina con función desconocida; por su parte, LOXL2, 3 y 4 presentan 4 dominios de tipo *scavenger* ricos en residuos de cisteína (SRCR), probablemente implicados en interacciones con otras proteínas (Maki and Kivirikko, 2001; revisado en Nishioka et al., 2012) (Figura 6). Dada la relación estricta que existe entre las lisil oxidasas y la matriz extracelular, el patrón de expresión de estas proteínas es bastante amplio. Se ha descrito la expresión de LOX en los fibroblastos de la piel, en las células epiteliales y en las células del músculo liso de la aorta y de los bronquiolos respiratorios, además de las células endoteliales y de los condrocitos (revisado en Csiszar, 2001). Los otros miembros de la familia también han sido detectados en muchos tejidos adultos como el corazón, el riñón, el pulmón, el páncreas y los músculos esqueléticos (Kim et al., 1995).

6.2 Las Lisil Oxidasas en fisiología y en la progresión tumoral

Muchos estudios han puesto de manifiesto como la LOX prototípica y la LOXL1 juegan un papel importante en los tejidos a nivel extracelular, tanto en el desarrollo embrionario como en condiciones patológicas, como la fibrosis: el patrón de expresión de estas enzimas se ha relacionado con el del colágeno de tipo I y de tipo III (Kim et al., 1999) y un aumento de la actividad enzimática de LOX ha sido relacionado con un aumento de expresión de colágeno tanto *in vitro* (Feres-Filho et al., 1995) como *in vivo* (Quaglini et al., 1993). Además, una expresión aberrante o una actividad enzimática elevada de LOX se han asociado a desorganización del tejido conectivo y a fibrosis (Royce et al., 1980; Khakoo et al., 1997; Sibon et al., 2005), mientras que estudios en ratones knock-out han demostrado la importancia de LOX y LOXL1 en la homeostasis de las fibras elásticas y en el desarrollo del sistema cardiovascular (Maki et al., 2002; Liu et al., 2004). No obstante, se ha documentado la presencia intracelular de diferentes miembros de la familia LOX a nivel intracelular, lo que pone de manifiesto otras posibles funciones para estas enzimas (Szauter et al., 2005; revisado en Lucero and Kagan, 2006). Estudios realizados en los últimos años han demostrado un papel para LOX en la transcripción génica (Giampuzzi et al., 2000), en la proliferación celular (Baker et al., 2011a) y en la formación y diferenciación de los huesos (Pischon et al., 2009).

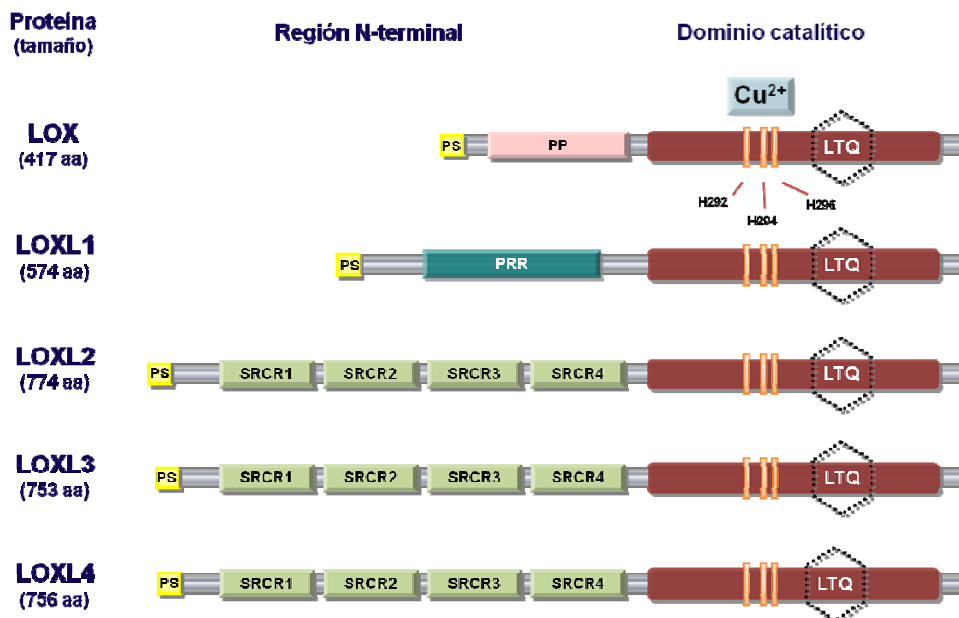


FIGURA 6: Organización estructural de las proteínas de la familia Loxil Oxidasa. Se indican los diferentes dominios de cada uno de los miembros de la familia LOX: Dominio Catalítico (marrón); PS: péptido señal; PP: pro-péptido; PRR: región rica en residuos de prolina; SRCR1-4: dominios scavenger ricos en residuos de cisteína; Cu²⁺: átomo de cobre; LTQ: residuo Lysil-Tirosil-Quinona. Se indican también los residuos de histidina implicados en la unión del cobre y en la actividad del residuo LTQ de LOX (López and Greenaway, 2011). Adaptado de Cano et al.,

Además, varios estudios han asociado la expresión de las proteínas de la familia LOX con enfermedades neoplásicas. Un aumento de la expresión de LOX se ha detectado en células de carcinomas de mama (Kirschmann et al., 1999), en tumores renales y en líneas derivadas (Stassar et al., 2001), y en carcinomas de células escamosas de esófago, donde su expresión parece relacionarse con las metástasis en los nódulos linfáticos y con un mal pronóstico (Sakai et al., 2009). En cáncer de mama, además, la expresión de LOX se encuentra aumentada en las células que presentan un fenotipo mas metastático e invasivo, por lo que esta proteína se considera un factor que promueve la metástasis aumentando la motilidad y la capacidad de migración de las células tumorales (Kirschmann et al., 2002; Payne et al., 2005). Además, Erler y col., demostraron que en condiciones de hipoxia las células tumorales inducen la expresión de LOX y que su secreción al medio condicionado y su actividad enzimática son necesarias para el desarrollo de las metástasis y la adquisición de un fenotipo invasivo (Erler et al., 2006). Por otro lado, se ha detectado un bajo nivel de expresión de LOX en cáncer de próstata (Ren et al., 1998), en cáncer gástrico (Kaneda et al., 2004) y en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (Rost et al., 2003), y en estos estudios se propone que LOX pueda actuar como un gen supresor de tumor, por lo que esta proteína podría tener un papel dual como promotor de metástasis o de supresor tumoral, dependiendo del tipo de cáncer (Sakai et al., 2009). De hecho, recientemente se ha descrito que el pro-péptido de la enzima LOX inhibe el crecimiento tumoral y favorece la apoptosis en modelos murinos de cáncer de mama, lo que apoya un papel anti-tumoral para esta proteína (Bais et al., 2012). También otros miembros de la familia LOX han sido relacionados con fibrosis, cáncer y progresión tumoral: LOXL1 ha sido implicada en la progresión tumoral y en la promoción de fibrosis tumoral (Akiri et al., 2003), mientras que se han detectado altos niveles de expresión de LOXL4 en carcinomas de células

escamosas de cabeza y cuello (Holtmeier et al., 2003; Görögh et al., 2007), en carcinomas colorectales (Kim et al., 2009) y en tumores de las cavidades serosas (Sebban et al., 2009). Recientemente, muchos estudios se han centrado en LOXL2, y dada la relevancia de estos trabajos y la importancia que se ha atribuido a esta proteína, se describirá a continuación la función que LOXL2 desempeña en la transición epitelio-mesénquima y en la progresión tumoral.

6.3 La Lisil Oxidasa 2 (LOXL2): papel en la TEM y en la progresión tumoral

LOXL2 ha sido quizás uno de los miembros de la familia de las Lisil Oxidasas más estudiados en los últimos años, habiendo sido implicada en procesos regulados por hipoxia, en la transición epitelio-mesénquima y en la remodelación de la matriz extracelular, además de en patologías como fibrosis y cáncer (Cano et al., 2012; revisado en Barker and Erler, 2011). Estudios previos de nuestro laboratorio han caracterizado LOXL2 como un importante regulador de la actividad funcional de Snail1 y como inductor de TEM (Peinado et al, 2005a). LOXL2 colocaliza con Snail1 en la zona perinuclear y lo regula a nivel post-traducciona incrementando la estabilidad de la proteína y por tanto su actividad transcripcional, siendo para ello necesarios dos residuos de lisina específicos (K98 y K137), localizados en la región de destrucción y de exporte nuclear (NES) de Snail1 (Peinado et al, 2005a). Además, estos estudios demostraron que LOXL2 (y en menor medida LOXL3) es capaz de inducir un proceso de TEM completo en las células epiteliales MDCK, y que su silenciamiento en las líneas tumorales murinas HaCa4 y CarB reduce su capacidad invasiva y tumorigénica (Peinado et al, 2005a; Peinado et al., 2008a). La implicación de LOXL2 en la TEM y progresión tumoral se ha reforzado con su caracterización como marcador de mal pronóstico en carcinomas de células escamosas de laringe y pulmón (Peinado et al., 2008a). Es de destacar que la sobreexpresión de LOXL2 en carcinomas de laringe asociada a mal pronóstico ocurre a nivel intracelular con un patrón típico perinuclear y citoplásmico (Peinado et al., 2008a), lo que refuerza el papel intracelular de LOXL2. Estos estudios también pusieron de manifiesto la acción de LOXL2 en la regulación de la TEM y de la diferenciación epidérmica mediante mecanismos dependientes e independientes de Snail1 (Peinado et al., 2008a), indicando la existencia de mecanismos adicionales y/o de interacción con otros factores para la acción de LOXL2 en estos procesos. Estudios recientes de nuestro laboratorio sobre los perfiles de expresión génica en tumores de mama de alto grado han mostrado la sobreexpresión del mRNA de *LOXL2* asociada a carcinomas de fenotipo basal (Moreno-Bueno et al., 2011), un subtipo de cáncer de mama muy agresivo y de mal pronóstico, con determinadas características moleculares, entre las que destacan la ausencia de receptores de estrógenos y de progesterona y de expresión de

ErbB2/neu, (Perou et al., 2000; revisado en Hergueta-Redondo et al., 2008) y que presenta marcadores típicos de TEM (Sarrió et al., 2008). Significativamente, la sobreexpresión intracelular de LOXL2 en los carcinomas basales de mama también ocurre en un patrón perinuclear y se asocia significativamente con la incidencia de metástasis a distancia (Moreno-Bueno et al., 2011). La sobreexpresión del mRNA de *LOXL2* también se asocia a metástasis de carcinomas basales de mama en varias series de bases de datos (Moreno-Bueno et al., 2011). Estos datos están de acuerdo con estudios recientes de otros grupos que muestran la asociación de LOXL2 con metástasis de carcinomas de mama en modelos preclínicos y la sobreexpresión del mRNA de *LOXL2* en bases de datos de carcinomas de mama negativos para receptores de estrógeno (Baker et al, 2011b). La expresión de LOXL2 también se ha asociado a un aumento de la capacidad invasiva en líneas celulares de carcinomas de páncreas y de ductos biliares (Rückert et al., 2010) y en algunos tipos tumorales, LOXL2 está expresada específicamente en tumores metastásicos e invasivos, comparado con tumores no metastásicos. Por ejemplo, la expresión de LOXL2 es alta en las líneas celulares y en los tumores de colon y esófago más agresivos, mientras que un bajo nivel de expresión de LOXL2 se asocia con tumores muy diferenciados y poco invasivos (Fong et al, 2007); altos niveles de expresión de LOXL2 también se detectan en adenocarcinomas cervicales (Chung et al, 2006).

En este contexto cabe destacar que muchas de las funciones mencionadas para la LOXL2 se han relacionado con su actividad enzimática y con la presencia del cofactor Lisil-Tirosil-Quinona (LTQ) en su dominio catalítico (Lucero and Kagan, 2006). Por ejemplo, la implicación de LOXL2 en la fibrosis hepática se ha relacionado con su actividad catalítica (Vadasz et al., 2005), mientras que la expresión de LOXL2 se ha asociado a la capacidad invasiva de líneas de carcinomas de mama, probablemente debido a su actividad enzimática (Kirschmann et al, 2002; Hollosi et al., 2009; Baker et al., 2011b). En el ámbito de la progresión tumoral se considera que la actividad enzimática de LOXL2 juega un papel importante en la generación de un estroma favorable para la formación del tumor. En apoyo a este papel, en algunos tipos de tumores, como el cáncer colorectal o el cáncer de mama, la expresión de LOXL2 se asocia a la de enzimas que remodelan la matriz extracelular, como la metaloproteasa 9 (MMP9) o el factor de inhibición de las metaloproteasas-1 (TIMP-1) (Offenberg et al., 2008). Asimismo, otros estudios recientes han mostrado que la inhibición de LOXL2 mediante anticuerpos específicos o por inhibidores químicos reduce la fibrosis de ciertos órganos y la capacidad tumorogénica o metastásica de varias líneas tumorales (Barry-Hamilton et al., 2010, Baker et al., 2011b). No obstante, trabajos recientes han evidenciado funciones de LOXL2 independientes de su actividad enzimática (Lugassy et al., 2011; Moreno-Bueno et al., 2011), y la evidencia actual indica que la expresión de LOXL2 intracelular juega un papel adicional o

complementario a su acción extracelular en la progresión tumoral (Peinado et al., 2008a; Moreno-Bueno et al., 2011).

7. LA METÁSTASIS Y EL NICHOS PRE-METASTÁSICO

El desarrollo de metástasis es un proceso complejo que implica varias etapas secuenciales, desde la invasión local a la intravasación, la extravasación y la generación de tumores a distancia (Chambers et al., 2002; Fidler, 2003). En los últimos años se han identificado factores genéticos y epigenéticos que regulan cada una de estas etapas: han sido descritos “genes de iniciación”, que promueven la motilidad celular y favorecen la invasión local, “genes de progresión” que regulan la extravasación, y “genes de virulencia” cuya función es fundamental para la colonización de los órganos secundarios (revisado en Nguyen et al., 2007; revisado en Nguyen et al., 2009). En realidad las células que se separan del tumor primario tienden a colonizar órganos secundarios específicos y distintos por cada tipo de tumor, lo que se conoce como órgano-especificidad de la metástasis (Gupta et al., 2005). Además los tiempos de latencia y de recurrencia son distintos por cada tipo y subtipo de tumor, lo que hace que aumente la complejidad del proceso (Sethi and Kang, 2011a; revisado en Nguyen et al., 2009). En los últimos años se ha postulado que el desarrollo eficiente de metástasis en órganos secundarios depende estrechamente del condicionamiento previo de dicho órgano mediante señales derivadas del tumor primario, lo que se conoce como el “nicho pre-metastásico” (revisado en Psaila & Lyden, 2009). Este proceso se regula por precursores de células derivadas de médula ósea (BMDCs, *Bone Marrow-Derived Cells*), que son reclutados a los sitios de metástasis y son capaces de crear un entorno favorable para la invasión y el crecimiento de las células tumorales (Kaplan et al., 2006) (Figura 7). Los primeros estudios realizados en 2005 demostraron que células precursoras hematopoyéticas (*Hematopoietic progenitor cells*, o HPCs) expresando el receptor para el factor de crecimiento del endotelio vascular 1 (VEGFR1) se localizan en los sitios pre-metastásicos (como los pulmones) antes de la llegada de las células metastásicas del tumor primario (Kaplan et al., 2005). Las HPCs VEGFR1⁺ reclutadas presentan una elevada expresión de los marcadores superficiales KIT y SCA1, típicos de las células precursoras hematopoyéticas inmaduras. Asimismo, se ha descrito que estas células son reclutadas preferencialmente a zonas ricas en fibronectina de los órganos secundarios debido a que expresan en su superficie la integrina $\alpha 4\beta 1$, un receptor preferente de la fibronectina (Kaplan et al., 2005). Como consecuencia del acúmulo focalizado de HPCs se producen cambios importantes en el microambiente metastático, con la síntesis de integrinas

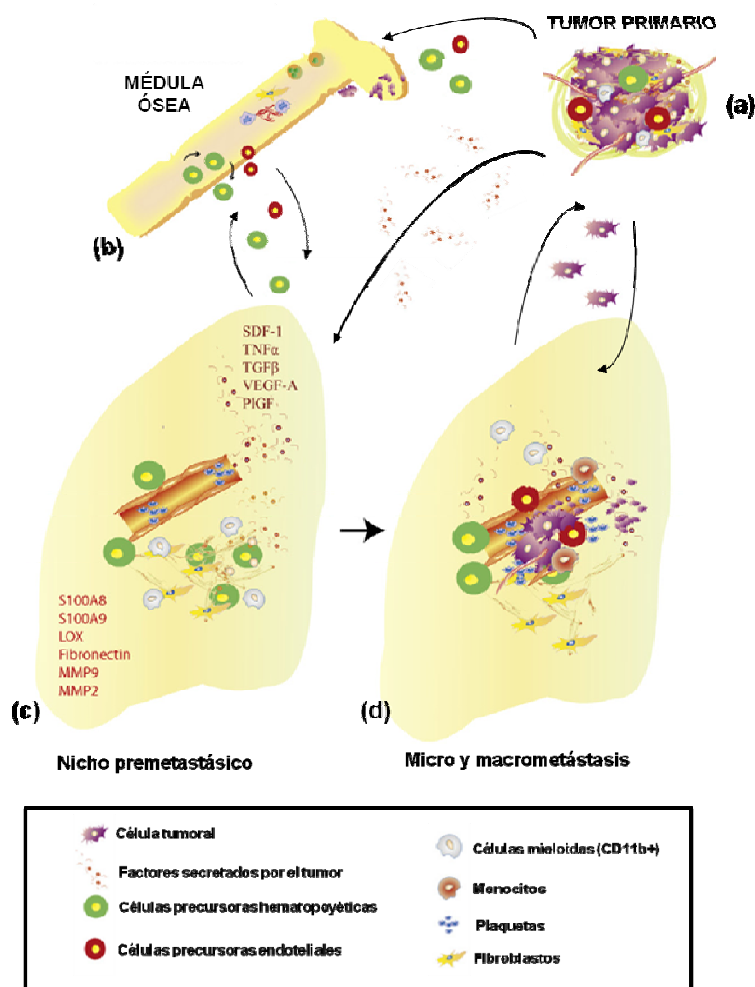


FIGURA 7: Representación esquemática de la evolución del nicho premetastático. En respuesta a factores de crecimiento (SDF-1= Factor derivado del estroma-1; $TNF\alpha$ = Factor de necrosis tumoral α ; $TGF\beta$ = Factor de transformación del crecimiento β ; VEGF-A= Factor de crecimiento del epitelio vascular A; PlGF= Factor de crecimiento de la placenta) secretados por el tumor primario (a), se induce en el pulmón una sobreexpresión de quimioquinas y citoquinas (S100A8, S100A9, LOX, Fibronectina, MMP2, MMP9) (c), que a su vez inducen el reclutamiento de poblaciones específicas de células derivadas de la médula ósea (*Bone Marrow Derived Cells* o BMDC) (b), como las células precursora hematopoyéticas (HPCs) y las células de linaje mieloide (CD11b⁺). Estas células, junto con los factores secretados por el tumor primario, inducen una remodelación de la matriz extracelular del pulmón. Los fibroblastos y las plaquetas también contribuyen a la formación del nicho premetastático. (d) Las células metastásicas empiezan a colonizar el pulmón y se activa la expresión de proteínas que favorecen el anclaje de las metástasis. El reclutamiento de células progenitoras del endotelio (*Endothelial Progenitor Cells*, o EPCs) y de monocitos favorece la creación de un entorno pro-angiogénico y la progresión de micrometástasis a macrometástasis. Adaptado de Peinado et al., 2011.

y quimioquinas así como la remodelación de la matriz extracelular que promueven el anclaje, la supervivencia y el crecimiento de las células metastásicas (Kaplan et al., 2006). Es importante destacar que son las células del tumor primario las principales responsables de la formación del nicho premetastático: de hecho el tumor primario secreta quimioquinas y factores que condicionan los órganos secundarios y determinan el patrón de diseminación de las células metastásicas (Kaplan et al., 2006). La movilización de células HPCs $VEGFR1^+$ de la médula ósea y su reclutamiento a los sitios pre-metastáticos se asoció inicialmente con la expresión por parte del tumor primario de citoquinas angiogénicas, como el Factor de Crecimiento del Epitelio Vascular A (VEGFA) o el Factor de Crecimiento de las Plaquetas (PlGF) (Kaplan et al., 2005). Posteriormente, se demostró que en realidad los tumores primarios secretan una gran cantidad y variedad de citoquinas, como el factor de necrosis tumoral α ($TNF\alpha$) o el factor de transformación del crecimiento β ($TGF\beta$), que a su vez inducen la expresión de quimioquinas inflamatorias (como las proteínas S100A8 y S100A9) en los órganos a colonizar como los pulmones, lo que contribuye al reclutamiento de BMDCs a los sitios premetastáticos (Hiratsuka et al., 2006). Muchos estudios han puesto de manifiesto que otras poblaciones de BMDCs están implicadas en la formación del nicho premetastático: por ejemplo, las células derivadas de precursores mieloides, que expresan el antígeno de

superficie CD11b, se reclutan a los pulmones como consecuencia de la inducción de S100A8 y S100A9, y su infiltración induce una reorganización de la matriz extracelular que favorece la invasión tumoral (Hiratsuka et al., 2006; Ye et al., 2010). Una vez reclutadas al nicho pre-metastásico, las células hematopoyéticas colaboran con las células del parénquima, las células del estroma y las células endoteliales del tejido secundario para crear un entorno favorable para la invasión de las células tumorales: así, favorecen la secreción de citoquinas y quimioquinas, como la interleuquina-1 (IL-1) o la interleuquina-6 (IL-6), de factores de crecimiento como el TNF α , y de enzimas que degradan la matriz extracelular, para finalmente facilitar el reclutamiento de las células metastásicas y la formación de micrometástasis (Hiratsuka et al., 2006; Hiratsuka et al., 2008; Mantovani et al., 2008; Peinado et al., 2008b) (Figura 7). Posteriormente, el reclutamiento de células precursoras del endotelio (*Endothelial Precursor Cells* o EPCs), que expresan el receptor para el factor de crecimiento del endotelio vascular 2 (VEGFR2), favorece la transición de micro a macrometástasis: las EPCs, reclutadas a partir de la médula ósea, inducen angiogénesis mediante la secreción de factores de crecimiento pro-angiogénicos, y estudios recientes han demostrado un papel esencial del factor Id1 en este proceso (Lyden D, 1999; Benezra et al., 2001; Lyden et al., 2001; Li et al., 2004; Gao et al., 2008).

Recientemente se ha demostrado un papel importante en la progresión tumoral para los exosomas, un tipo de vesículas extracelulares secretadas por las células tumorales (Muralidharan-Chari et al., 2010; Peinado et al., 2011). Se conoce la importancia de estas microvesículas en la comunicación inter-celular, y estudios recientes están poniendo de manifiesto un papel para los exosomas en la creación de un microambiente favorable para el tumor (revisado en Peinado et al., 2011). Por ejemplo, se ha demostrado que los exosomas secretados por las plaquetas inducen angiogénesis y promueven las metástasis en cáncer de mama (Janowska-Wieczorek et al., 2005; Janowska-Wieczorek et al., 2006), y los últimos estudios demuestran que los exosomas no solo influyen en el crecimiento del tumor primario, sino que también participan en el traslado de material entre el tumor y las células endoteliales, del estroma o de la médula ósea (Cocucci et al., 2009; Aliotta et al., 2010; Nazarenko et al., 2010). Además, se ha demostrado recientemente que los exosomas secretados por el tumor primario pueden influenciar la diferenciación de las células mieloides, promoviendo el desarrollo de células con fenotipo CD11b⁺/Gr1⁺ (Xiang et al., 2009). Estos datos están abriendo la vía a la nueva hipótesis sobre el papel de los exosomas en la formación del nicho pre-metastásico, como se ha demostrado en modelos de cáncer de próstata o de páncreas (Castellana et al., 2009; Jung et al., 2009). Así, se ha planteado que los exosomas secretados por el tumor primario estarían educando a las BMDCs para su reclutamiento a los sitios

metastásicos, contribuyendo de tal manera a la progresión tumoral y al desarrollo de las metástasis (Peinado et al., 2012).

Durante la formación del nicho pre-metastásico y la subsiguiente colonización, la remodelación del tejido local es un evento esencial para favorecer la invasión de las células tumorales y permitir el crecimiento de los focos metastásicos, lo que ocurre gracias a la secreción en el nicho pre-metastásico de metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) (Kaplan et al., 2005). Por ejemplo, la MMP-9 se ha encontrado sobreexpresada en los pulmones premetastásicos como consecuencia de la infiltración de células VEGFR1⁺, lo que favorece la degradación de la matriz extracelular y permite el acceso de las células metastásicas (Hiratsuka et al., 2002). Recientemente, se ha descrito un papel importante de las enzimas de la familia LOX en la formación del nicho pre-metastásico pulmonar en cáncer de mama: la secreción de la enzima LOX permite modificar la matriz extracelular y facilita la movilización de BMDCs y el reclutamiento de células del tumor primario a los sitios de metástasis (Erler et al., 2009). Así, la LOX secretada por células del tumor primario en respuesta a hipoxia se acumula en los pulmones pre-metastásicos, donde modifica la matriz extracelular favoreciendo la formación de enlaces covalentes en las fibras de colágeno, haciéndola más receptiva para la infiltración de células mieloides (Erler et al., 2009). Además, la inhibición de la secreción de LOX en células humanas de carcinoma de mama es capaz de inhibir el reclutamiento de células mieloides a los órganos premetastásicos en ratones implantados ortotópicamente con dichas células, ralentizando así el proceso metastático (Erler et al., 2009). Más recientemente se ha descrito un mecanismo similar para otros miembros de la familia: en condiciones de hipoxia, células de cáncer de mama humanas secretan altos niveles de LOX, LOXL2 y LOXL4, lo que favorece la infiltración de BMDCs a los pulmones y la consecuente colonización por parte de las células metastásicas (Wong et al., 2011). De hecho, se ha demostrado también que la inhibición de HIF1 α , el principal responsable de la hipoxia intra-tumoral, es capaz de bloquear la expresión LOX y LOXL4, y el consecuente reclutamiento de BMDCs a los sitios metastásicos (Wong et al., 2012).

Estos estudios recientes demuestran que los miembros de la familia LOX están adquiriendo un papel clave en la regulación del nicho pre-metastásico, probablemente debido a la capacidad de estas proteínas de modificar la matriz extracelular y crear así un entorno favorable para las metástasis (Erler et al., 2009; Wong et al., 2011). Todavía, se desconoce la implicación y el mecanismo de acción de otros miembros de la familia (como LOXL2), lo que representa una importante área de investigación y sería de gran utilidad para comprender mejor los mecanismos que regulan la formación del nicho pre-metastásico y la formación de las metástasis.

OBJETIVOS

Los estudios realizados hasta la fecha indican que el factor bHLH E47 (codificado por el gen *E2A*) está implicado en la represión de *cadherina-E* a nivel transcripcional, de forma dependiente de las cajas E del elemento E-pal del promotor de ratón; además, E47 actúa como un inductor de TEM. No obstante, los mecanismos específicos de represión transcripcional de E47 no son totalmente conocidos, no existiendo estudios que identifiquen nuevos factores de interacción. Por otra parte, se desconoce en gran medida el papel de E47 en la progresión tumoral, especialmente en carcinomas. Por ello, y en base a las líneas de investigación del laboratorio, al inicio de esta Tesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Papel del gen *E2A* en la iniciación y progresión tumoral de carcinomas.
2. Búsqueda de posibles factores de interacción de E47: caracterización de la interacción funcional entre E47 y LOXL2.
3. Estudio de la implicación de E47 y LOXL2 en la formación del nicho pre-metastásico y la generación de metástasis.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Plásmidos de DNA

1.1 Vectores de expresión

En esta tesis se han utilizado diversos vectores generados previamente en nuestro grupo.

Los vectores pcDNA3-mE47, pEGFP-mE47 y pGEX4T1-mE47 se generaron en el laboratorio (Pérez-Moreno, et al. 2001; Cubillo, 2007) y llevan la secuencia completa del cDNA de *E47* de ratón sin fusionar, fusionada a la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP) o a la proteína de fusión GST, respectivamente. El plásmido pZeo-mE47ΔAD1 lleva la secuencia del cDNA de *E47* de ratón con la delección del dominio de transactivación AD1 (E. Cubillo, datos no publicados), sin fusionar.

Los vectores pcDNA3-mLOXL2 y pcDNA3-mLOXL2ΔCD se generaron en nuestro laboratorio (Peinado, 2005a; Moreno-Bueno, 2011) y llevan la secuencia completa del cDNA de *LOXL2* de ratón o con delección de los aminoácidos 548 a 688 que comprenden el dominio catalítico, respectivamente.

Todos los plásmidos utilizados en esta memoria están recogidos en la Tabla 1.

TABLA 1: vectores de expresión en eucariotas

<u>Plásmido</u>	<u>Especie</u>	<u>Tag</u>	<u>Referencia</u>
pcDNA3-mE47	Ratón	-----	Pérez-Moreno e al., 2001
pZeo-mE47ΔAD1	Ratón	-----	E. Cubillo (no publicado)
pEGFP-mE47	Ratón	EGFP	E. Cubillo, 2007
pGEX4T1-mE47	Ratón	GST	Pérez-Moreno e al., 2001
pcDNA3-mLOXL2	Ratón	Flag	Peinado et al., 2005a
pcDNA3-mLOXL2ΔCD	Ratón	Flag	Moreno-Bueno et al., 2011

1.2 Vectores mutantes generados

En el contexto de este trabajo, se han generado vectores de expresión de diferentes formas mutantes de E47 a partir del plásmido conteniendo el gen murino de E47 fusionado en el extremo N-terminal a una copia del gen EGFP (pEGFP-E47). Se generaron tres mutantes puntuales distintos, cada uno con mutaciones en varios residuos de lisina (lisina a alanina) localizados en el dominio *Rep* de E47 (Figura 8): el mutante EGFP-E47-2K porta las mutaciones K498A y K502A; el mutante EGFP-E47-3K porta las mutaciones K519A, K520A y K523A; el mutante EGFP-E47-5K porta las mutaciones K498A, K502A, K519A, K520A, K523A (Figura 8). Los mutantes EGFP-E47-2K y EGFP-E47-3K se obtuvieron por mutagénesis dirigida (Zheng et al., 2004). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se encuentran descritas en la Tabla 2. El mutante EGFP-E47-5K se obtuvo con el mismo protocolo, utilizando como molde el mutante EGFP-E47-2K y como oligonucleótidos los utilizados para la generación del mutante EGFP-E47-3K. En ambos casos las condiciones de PCR fueron las siguientes:

- 30 seg a 94°C,
- (30 seg a 94°C, 1 min a 55°C, 9 min a 68°C) x 40 repeticiones,
- 10 min a 70°C.

Posteriormente, los plásmidos mutados se secuenciaron con los oligonucleótidos adecuados para confirmar la mutación de los residuos específicos de lisina a alanina.



FIGURA 8: Esquema del dominio *Rep* de E47 y de las mutaciones puntuales generadas en los mutantes EGFP-E47-2K, EGFP-E47-3K y EGFP-E47-5K. En negrita y subrayados se muestran los aminoácidos mutados (lisina a alanina).

Tabla 2: Oligonucleótidos empleados para la generación de los mutantes de E47

<u>MUTANTE</u>	<u>SECUENCIA</u>
EGFP-E47 2K	5'-GAGATC <u>GCCC</u> GGGAGGAG <u>GCC</u> GAGGATGAGGAAATCGCATCAGTAGCCGACGCC-3' 5'-ATCCTC <u>GGC</u> CTCCTCCCG <u>GGC</u> GATCTCGCTGGCACCCGCTGTTGTGCC-3'
EGFP-E47 3K	5'-GAGGAC <u>GCCGCC</u> GACCTG <u>GCC</u> GTCCACGCACGCGCACCAGCAGTACAGATGAG-3' 5'-TGGGAC <u>GGC</u> CAGGTC <u>GGCGGC</u> GTCTCTTCGGCGTCGGCTACTGATGCGATTTCCTC-3'
EGFP-E47 5K	5'-GAGGAC <u>GCCGCC</u> GACCTG <u>GCC</u> GTCCACGCACGCGCACCAGCAGTACAGATGAG-3' 5'-TGGGAC <u>GGC</u> CAGGTC <u>GGCGGC</u> GTCTCTTCGGCGTCGGCTACTGATGCGATTTCCTC-3'

TABLA 2: Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la generación de los vectores mutantes pEGFP-E47-2K, pEGFP-E47-3K y pEGFP-E47-5K. En negrita y subrayados se evidencian los tripletes que codifican para los aminoácidos mutados (alanina).

1.3 Plásmidos reporteros

Los plásmidos reporteros utilizados en los ensayos de actividad promotora contienen el cDNA de un gen (habitualmente *luciferasa*) cuya expresión es cuantificable y que se encuentra bajo el control de una región promotora determinada cuya actividad se quiere estudiar. Los plásmidos utilizados en esta memoria contienen el gen reportero *luciferasa* bajo el control de distintos promotores, como se especifica en la Tabla 3.

Tabla 3: Plásmidos reporteros

<u>Región promotora</u>	<u>Especie</u>	<u>Referencia</u>
<i>cadherina-E</i> (-178/+92)	Ratón	Lab Dra A. Cano (Bolós et al, 2003)
<i>claudina-1</i> (-82/+236)	Humano	Martínez-Estrada et al, 2006
<i>Lgl2</i> (p673: -743/+135)	Humano	Lab. Dr T. Brabletz, Universidad de Friburgo (Spaderna et al, 2008)
pCMV-βGalactosidasa	-	Promega

2. Líneas celulares y cultivos celulares

En esta memoria se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- HEK293T: procedente de tejido renal embrionario humano transformadas con el antígeno T grande del virus SV40 (ATCC # CRL-11268™)
- MDCK: procedente del epitelio simple de riñón de perro (ATCC # CRL-2936™)
- MDCK-EGFP, MDCK-EGFP-E47, MDCK-LOXL2: clones derivados de la línea MDCK, expresando establemente EGFP, EGFP-E47 o LOXL2 humana, respectivamente, obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Pérez-Moreno et al, 2001; Cubillo E, 2007; Peinado et al., 2005a)
- Eo771-mCherryLuc: obtenida partir de la línea celular Eo771 (derivada de un carcinoma mamario de ratón generado en ratones C57/BL6) (Ewens et al., 2005), expresando establemente la proteína rojo fluorescente mCherry y la enzima Luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*). Esta línea celular fue cedida amablemente por el laboratorio del Dr. David Lyden (Cornell Weill Medical Center, New York, USA).
- 4T1-mCherryLuc: obtenida a partir de la línea 4T1 (derivada de un carcinoma mamario de ratón) (Dexter et al., 1978), expresando establemente la proteína rojo fluorescente mCherry y la enzima Luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*). Esta línea celular fue cedida amablemente por el laboratorio del Dr. David Lyden (Cornell Weill Medical Center, New York, USA)

Las células HEK293T, las células MDCK y sus clones derivados y las células 4T1-mCherryLuc fueron crecidas en medio DMEM (Gibco BRL); las células Eo771-mCherryLuc y sus clones derivados (Eo771-shControl, Eo771-shE47, Eo771-shLOXL2) fueron crecidas en medio RPMI (Gibco BRL). En ambos casos los medios se suplementaron con 10% suero fetal bovino, 2 mM glutamina (Gibco BRL), 100 µg/ml ampicilina, 32 µg/ml gentamicina y 2,5 µg/ml fungizona. Todos los cultivos celulares se crecieron a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂.

3. Transfecciones

Todas las transfecciones se realizaron con el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.1 Transfecciones transitorias

Para los ensayos de actividad promotora se sembraron 3×10^4 células (HEK293T) por pocillo de placas T24 (Falcon). Al día siguiente, se transfectaron con 200 ng de los plásmidos reporteros indicados y con 10 ng del plásmido pCMV- β -galactosidasa (Promega) como control de la eficiencia de transfección. Los ensayos de co-transfección se realizaron en presencia de las cantidades indicadas en cada caso de los vectores de expresión pcDNA3-mE47, pZeo-E47- Δ AD1, pcDNA3-mLOXL2 y pcDNA3-mLOXL2 Δ CD (de ratón) (Tabla 1). La cantidad de DNA total transfectado en todas las condiciones de un experimento se igualó utilizando los plásmidos pcDNA3 o pZeo vacíos. Transcurridas 36 h de la transfección se realizaron los ensayos de actividad promotora como se describe en el apartado 4.

Para los ensayos de inmunoprecipitación de E47 y LOXL2 se sembraron 1×10^6 células MDCK-EGFP-E47 en placas de 100 mm (Falcon) y se transfectaron al día siguiente con 24 μ g del vector pcDNA3-mLOXL2-Flag. Transcurridas 24 h se realizaron los ensayos de inmunoprecipitación como se describe en el apartado 7.2.

Para los ensayos de pull-down de E47 y LOXL2 se sembraron $3,5 \times 10^5$ células HEK293T en placas de 60 mm (Falcon) y se transfectaron al día siguiente con 8 μ g del vector pcDNA3-LOXL2-Flag de ratón. Transcurridas 24 h se realizaron los ensayos de pull-down como se describe en el apartado 7.3.

Para los ensayos de co-localización de E47 y LOXL2 se sembraron $3,5 \times 10^5$ células MDCK EGFP-E47 sobre cubreobjetos de cristal de 10/12 mm de diámetro en placas de 60 mm (Falcon). Las células MDCK-EGFP-E47 se transfectaron al día siguiente con 8 μ g del vector pcDNA3-LOXL2-Flag de ratón. Transcurridas 24 h se realizaron los ensayos de inmunofluorescencia como se describe en el apartado 7.5.

3.2 Silenciamiento mediante interferencia génica

Las líneas Eo771shE47 y Eo771shLOXL2 se generaron mediante infección lentiviral de las células parentales Eo771mCherryLuc. Para la eliminación selectiva del mRNA de E47 y de LOXL2 mediante interferencia de RNA se utilizaron los plásmidos pLKO-puro (Sigma Aldrich) y pGIPZ-puro (Open Biosystem), respectivamente. Estos plásmidos están diseñados para la expresión de precursores de horquillas cortas de RNA (shRNAs), que una vez en el citoplasma de las células son reconocidos por la maquinaria celular y procesados para generar los RNA de interferencia de doble cadena que dirigen la degradación o bien impiden la traducción de los mRNA de interés. Las secuencias de los shRNAs para la interferencia de E47 y LOXL2 se indican en la Tabla 4.

3.2.1 Generación de lentivirus

Para la generación de lentivirus, se sembraron 8×10^6 células HEK293T en frascos de cultivos de 75 mL (Falcon) y se dejaron crecer en medio sin antibiótico durante toda la noche. Al día siguiente se transfectaron con los plásmidos de empaquetamiento lentiviral pLP1 (3,9 μ g), pLP2 (2,6 μ g), pLPVsVg (3,3 μ g) y con los vectores pLKO-puro o pGIPZ-puro conteniendo las secuencias específicas para el silenciamiento del gen de interés (shRNA, 10 μ g). Después de 48 h, se recogió y se filtró el sobrenadante del medio de cultivo conteniendo las partículas lentivirales, y se utilizó, bien para la infección en las líneas celulares indicadas, o bien se congeló a -80°C para su posterior uso. Como control se utilizó el vector lentiviral sh-pLKO.1, que contiene una secuencia shRNA que no interfiere la expresión de ningún gen (Sigma Aldrich).

Tabla 4: Secuencia de shRNA en los vectores lentivirales

<u>NOMBRE</u>	<u>SECUENCIA sh</u>	<u>CASA COMERCIAL</u>
shE47	5'-CCGGCCCGGATCACTCCAGCAATAACTCGAG TTATTGCTGGAGTGATCCGGGTTTTTG-3'	SIGMA
shLOXL2	5'-TGCTGTTGACAGTGAGCGCCCCTGCAGAGAA GACCTACAATAGTGAAGCCACAGATGTATTGT AGGTCTTCTCTGCAGGGATGCCTACTGCCTCGGA-3'	OPEN BIOSYSTEM

3.2.2 Infección lentiviral

Para la infección, se añadieron 5 mL de sobrenadante lentiviral a 1×10^6 células Eo771mCherryLuc previamente sembradas en placas de 100 mm (Falcon), y se añadió polibreno (8 μ g/mL) para aumentar la eficiencia de infección. Transcurridas 6-9 horas, se añadió un volumen equivalente de medio fresco, y al cabo de 24 h se cambió el sobrenadante lentiviral diluido por medio fresco libre de virus. Tras la infección, las células se seleccionaron durante 3-4 días en presencia de puromicina, de tal manera que el cultivo celular seleccionado se utilizó como conjunto de células resistentes (*pool*), y sobre él se aislaron posteriormente varios clones por dilución límite y posterior aislamiento y expansión de colonias resistentes a puromicina.

4. **Ensayo de actividad promotora**

La actividad del promotor murino de *cadherina-E* (-178/+92) (Bolós et al, 2003) y de los promotores humanos de *claudina-1* (-82/+236) (Martínez-Estrada et al., 2006) y de *Lgl2* (p673:

-743/+135) (Spaderna et al, 2008), se determinó en ensayos de transfección transitoria a las 36 h de la transfección, tal como se ha descrito previamente (Bolós et al, 2003; Peinado et al, 2005a; Moreno-Bueno et al., 2009). Las actividades luciferasa y β -galactosidasa se determinaron con el kit "Dual-Luciferase Reporter assay" (Promega) utilizando un luminómetro Lumat LB 9507 (Berthold Technologies). La actividad relativa luciferasa/ β -galactosidasa (RLU) se normalizó para la actividad detectada en las células control transfectadas con el vector vacío (pGL2). Todos los ensayos se realizaron en muestras por triplicado para cada punto del experimento, realizándose al menos tres experimentos de cada condición analizada.

5. Análisis de RNA mensajero

5.1 Extracción de RNA total y síntesis de cDNA

Para las líneas celulares la extracción de RNA total se realizó a partir de $1,5 \times 10^6$ células, empleando el kit RNeasy Mini (Qiagen) según instrucciones del fabricante.

El RNA de los tejidos (tumores primarios y pulmones) se obtuvo utilizando el método descrito por Chomczynski and Sacchi, utilizando trizol (Chomczynski and Sacchi, 1987). Brevemente, en primer lugar se añadió 1 ml de trizol a cada tubo y se homogeneizó usando una jeringuilla. A continuación se añadió y mezcló con 0,2 ml de cloroformo, centrifugándose durante 15 min a 13.000 r.p.m. La fase acuosa se aisló, y se añadió 0,5 ml de isopropanol frío para precipitar el RNA. Tras la precipitación, los tubos se centrifugaron a 4°C durante 30 min a 13.000 r.p.m. Se eliminó el sobrenadante, y se lavó el precipitado con etanol al 75%. Tras eliminar el etanol del último lavado, se secó el RNA a temperatura ambiente, y se resuspendió finalmente en 50 μ l de agua libre de nucleasas. La cantidad y calidad del RNA obtenido se evaluaron mediante análisis espectrofotométrico.

Para la síntesis de DNA complementario (cDNA) se retrotranscribieron 2 μ g de RNA total con la enzima MLV-RT (Promega), utilizando oligo-dT como cebador. Para la retrotranscripción se empleó el siguiente protocolo: 5 min a 70°C, 1 h a 42°C y 1 h a 42°C, tal como está descrito (Moreno-Bueno et al., 2009).

5.2 Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR

Cada PCR semi-cuantitativa se realizó a partir de 100 ng de cDNA, empleando el reactivo REDExtract-N-Amp Tissue PCR kit (Sigma Aldrich) y los oligonucleótidos correspondientes a una concentración final de 0,5 μ M. En la Tabla 5 se indican las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar fragmentos de los mRNA de *cadherina-E*, *LOXL2* y *E47* de ratón, así

como las condiciones empleadas para la amplificación. El mRNA del gen *gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH)* se amplificó conjuntamente con cada condición como gen calibrador.

Tabla 5: Secuencia de los oligonucleótidos usados en PCR semi-cuantitativa

<u>RT-PCR</u>	<u>OLIGONUCLEÓTIDOS (5'-3')</u>	<u>CONDICIONES</u>	<u>TAMAÑO</u>
Cadherina-E	FW: GGAATCCTTGGAGGGATCCTC RV: GTCGTCCTCGCCACCGCCGTACAT	<u>30 ciclos:</u> -94°C 1 min -60 °C 1 min -72°C 1 min 30 seg	~550 pb
LOXL2	FW: ATGGAAATATCTTCGCCAACAAC RV: GCTGGTTATTTAGAAGTCCACTGA	<u>30 ciclos:</u> -94°C 1 min -62 °C 1 min -72°C 2 min	~800 pb
E47	FW: GTACAGATGAGGTGCTGTCCCT RV: GACACCTTCTCCTCCTCCCTC	<u>30 ciclos:</u> -94°C 1 min -60 °C 1 min -72°C 1 min 30 seg	~300 pb
GAPDH	FW: CTTCAACCACCATGGAGGAGGC RV: GGCATGGACTGTGGTCATGAG	<u>30 ciclos:</u> -94°C 1 min -60 °C 1 min -72°C 1 min 30 seg	~800 pb

5.3 Análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real (qPCR)

Para la realización de qPCR se utilizaron dos métodos distintos. Para algunos genes (ver Tabla 6) se utilizó el sistema TaqMan® Gene Expression de Applied Biosystems. Para estos ensayos se utilizaron sondas específicas contra cDNA, marcadas con el reportero fluorescente TAMRA, y como mezcla de reacción “iQ Supermix” (BioRad). Las sondas que se utilizaron se recogen en la Tabla 6. Para realizar estos ensayos se utilizaron 100 ng de cDNA de cada muestra, realizándose los análisis por triplicado. Como mRNA calibrador se utilizó la β -actina.

Alternativamente, para el estudio de expresión de algunos genes (ver Tabla 6) se empleó el kit “SYBR Green Supermix” (BioRad) utilizando una pareja de cebadores específicos contra los genes de interés a una concentración de 0,3 μ M. Las secuencias de las parejas de oligonucleótidos utilizadas se recogen en la Tabla 6. Al igual que el caso anterior se utilizaron

100 ng de cDNA para las reacciones de amplificación, realizándose los análisis por triplicado. Como mRNA calibrador se usó GAPDH.

Las qPCR se llevaron a cabo mediante los siguientes programas:

Para el protocolo con sondas Taqman:

- 3 min a 95º C
- (10 seg a a 95º C – 30 seg a a 60º C) x 40 repeticiones
- 10 min a 72º C

Para el protocolo con “SYBR Green”:

- 5 min a 95º C
- (15 seg a 95º C - 30 seg a 60º C - 30 seg a 72º C) x 40 repeticiones
- 10 min a 72º C
- 10 seg a 55º C, incrementando la temperatura 0,5º C en cada ciclo hasta alcanzar los 95º C (81 ciclos en total), para la determinación de la curva de fusión.

La expresión génica se calculó mediante el método de ΔC_t , determinando el número de copias del gen de interés frente al de un gen de expresión constitutiva (β -actina o GAPDH) según la siguiente expresión:

$$\Delta C_t = 2^{C_t \text{ control} - C_t \text{ problema}}$$

Donde ΔC_t es la expresión normalizada del gen de interés frente a la expresión del gen constitutivo; C_t es el ciclo umbral; control es el gen de expresión constitutiva y problema el gen de interés.

6. Anticuerpos

Los diferentes anticuerpos primarios y secundarios utilizados en esta memoria, así como su origen, procedencia y dilución utilizada en las diferentes aplicaciones en las que se han empleado se describen en las Tablas 7 y 8.

Tabla 6: Secuencia de los oligonucleótidos usados en qPCR

<u>GEN</u>	<u>SECUENCIAS (5' - 3')</u>	<u>CASA COMERCIAL</u>	<u>APLICACIÓN</u>
CADHERINA-E	Ref. Mm01247357_m1	Applied Biosystem	Taqman
E47 (TCF3)	Ref. Mm01175593_m1	Applied Biosystem	Taqman
FIBRONECTINA	Ref. Mm01199483_m1	Applied Biosystem	Taqman
LOX	Ref. Mm00495386_m1	Applied Biosystem	Taqman
LOXL1	Ref. Mm01145738_m1	Applied Biosystem	Taqman
LOXL2	Ref. Mm00804740_m1	Applied Biosystem	Taqman
LOXL3	Ref. Mm00442953_m1	Applied Biosystem	Taqman
LOXL4	Ref. Mm00446385_m1	Applied Biosystem	Taqman
β-ACTINA	NM_007393.1	Applied Biosystem	Taqman
ANG-1	FW: CAGTTTTCCTTTCCTTTCATTCT RV: GGTTGCTGCACCCTATGTGA	SIGMA	SybrGreen
GM-CSF	FW: CGTCTCTAACGAGTTCTCCTTC RV: CCCTTGAGTTTGGTGAAATTGC	SIGMA	SybrGreen
S100A8	FW: GGAAATCACCATGCCCTCTACAA RV: ATGCCACACCCACTTTTATC	SIGMA	SybrGreen
S100A9	FW: GGAGCGCAGCATAACCACCATC RV: GCCATCAGCATCATACACTCCTCA	SIGMA	SybrGreen
TENASCINA-C	FW: AACCTGATGGGCAGATATGG RV: CCAGATTTGGAAGTTGCTG	SIGMA	SybrGreen
TGFβ	FW: GCCACTGCCCATCGTCTACT RV: CGCACAATCATGTTGGACAAC	SIGMA	SybrGreen
TNFα	FW: GCCTCTTCTATTCTGCTT RV: CTCCTCCACTTGGTGGTTTG	SIGMA	SybrGreen
GAPDH	FW: CTTCAACCACCATGGAGGAGGC RV: GGCATGGACTGTGGTCATGAG	SIGMA	SybrGreen

Tabla 7: Anticuerpos primarios

<u>ANTICUERPO</u>	<u>ESPECIE</u>	<u>TIPO</u>	<u>APLICACIÓN</u>				<u>PROCEDENCIA</u>
			WB	IF	IP	CF	
Cadherina-E (clon ECCD-2)	Rata	Monoclonal	1:500	----	----	----	M. Takeichi, Universidad de Kyoto (Japon)
CD11b-FITC	Ratón	Monoclonal	----	----	----	0,5 µg/1x10 ⁶ células	BD
c-kit-APC (clon 2B8)	Ratón	Monoclonal	----	----	----	0,15µg/1x10 ⁶ células	BD
E2A	Conejo	Policlonal	1:500	1:100	----	----	A.T. Look, Dana-Farber Cancer Institute, Boston (USA)
EGFP	Conejo	Policlonal	----	----	2 µg	----	Molecular Probes
EGFP	Conejo	Policlonal	1:5000	----	----	----	Sigma
Fibronectina	Ratón	Monoclonal	1:5000	1:400	----	----	BD
FLAG	Ratón	Monoclonal	1:1000	1:250	5 µg	----	Sigma
Gr1-PE (clon RB6-8C5)	Ratón	Monoclonal	----	----	----	0,15µg/1x10 ⁶ células	BD
GST	Conejo	Policlonal	1:1000	----	----	----	Sigma
LOX	Conejo	Policlonal	1:1000	1:100	----	----	K. Csiszar, John A Burns School of Medicine, University of Hawaii, Honolulu, (USA)
LOXL2 (clon 675-774)	Ratón	Monoclonal	1:1000	----	----	----	Abnova
LOXL2	Conejo	Policlonal	1:1000	1:100	----	----	K. Csiszar, John A Burns School of Medicine, University of Hawaii, Honolulu, (USA)
LOXL3	Conejo	Policlonal	1:1000	----	----	----	K. Csiszar, John A Burns School of Medicine, University of Hawaii, Honolulu, (USA)
Sca-1-PE (clon D7)	Ratón	Monoclonal	----	----	----	0,15µg/1x10 ⁶ células	BD
Snail1 (clon L70G2)	Ratón	Monoclonal	1:1000	----	----	----	Cell Signaling
Snail2 (clon C19G7)	Conejo	Monoclonal	1:1000	----	----	----	Cell Signaling
Tubulina	Ratón	Monoclonal	1:10000	----	----	----	Sigma
Zeb-1 (clon E-20)	Cabra	Policlonal	1:1000	----	----	----	Santa Cruz Biotechnology

WB= western blot; IF= inmunofluorescencia; IP= inmunoprecipitación; CF= citometría de flujo

Tabla 8: Anticuerpos secundarios

ANTICUERPO	ESPECIE	APLICACION		PROCEDENCIA
		WB	IF	
Anti-conejo-HRP	Cabra	1:5000	-----	GE Healthcare
Anti-ratón-HRP	Oveja	1:1000	-----	GE Healthcare
Anti-rata-HRP	Cabra	1:1000	-----	GE Healthcare
Anti-conejo Alexa 488/546/647	Cabra	-----	1:800	Molecular Probes
Anti-ratón Alexa 488/546/647	Cabra	-----	1:800	Molecular Probes

WB= western blot; IF= inmunofluorescencia

7. Análisis de proteínas en cultivos celulares

7.1 Obtención de extractos totales

Los extractos proteicos totales se obtuvieron lisando las células en tampón RIPA (0,1% SDS, 0,5% deoxicolato sódico, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (2 mM PMSF, 2µg/ml leupeptina, 20 ng/ml aprotinina, 1 mM ortovanadato). Los lisados se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 20 min y la fase acuosa, conteniendo las proteínas, se aisló para la evaluación de la concentración proteica mediante el método BCA (Thermo Scientific). Las muestras cuantificadas se guardaron a -20°C hasta su utilización.

7.2 Inmunoprecipitación de proteínas

Los extractos para analizar las interacciones proteicas se prepararon en la solución de inmunoprecipitación (IPH) (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5% NP-40), suplementada con inhibidores de proteasas y fosfatasas (2mM PMSF, 2 µg/ml leupeptina, 20 ng/ml aprotinina, 1 mM ortovanadato). Posteriormente, un 10% de los lisados celulares se reservó como control (input), y 500-700 µg se pre-absorbieron con 20 µl de proteína G-sepharosa (Sigma Aldrich) y se incubaron posteriormente con los anticuerpos correspondientes a 4°C durante toda la noche. A continuación se incubaron con 50 µl de proteína G-sepharosa durante 1 h a 4°C. Tras tres lavados en solución IPH, la fracción inmunoprecipitada se resuspendió en tampón Laemmli 1X y las proteínas inmunoprecipitadas

junto con los correspondientes “inputs” se resolvieron en geles desnaturalizantes SDS-PAGE y se analizaron por western blot tal como se describe en el correspondiente apartado. En todos los casos, los resultados mostrados corresponden a un experimento representativo de, al menos, tres realizados.

7.3 Ensayo de pull down

La proteína recombinante de fusión GST-E47 se obtuvo a partir de la cepa bacteriana BL21 transformada con el vector pGEX4T1-mE47 tal como se ha descrito (Bolós et al., 2003; Pérez-Moreno et al., 2001). La proteína de fusión se incubó para su unión específica con la resina Glutathion-Sepharosa (GSH) (GE Healthcare Amersham) durante 1 h a 4°C en agitación. Tras tres lavados en tampón BFX (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 1M NaCl, 0,2 mM EDTA) y tres lavados en tampón GST-FISH (10% Glicerol, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM MgCl₂), el complejo GSH-GST-E47 se incubó con extractos en tampón IPH obtenidos de células HEK293T expresando de forma transitoria el vector pcDNA3-LOXL2-Flag de ratón. Tras tres lavados en solución GST-FISH, el complejo GSH-GST-E47-LOXL2-Flag se eluyó en tampón Laemmli 1X y las proteínas de interés se detectaron mediante western blot con los anticuerpos correspondientes. 40 µg de los extractos obtenidos en tampón IPH (inputs) se resolvieron asimismo en geles desnaturalizantes PAGE-SDS y se analizaron por western blot tal como se describe en el siguiente apartado. En todos los casos, los resultados mostrados corresponden a un experimento representativo de, al menos, tres realizados.

7.4 Análisis de proteínas mediante Western blot

Entre 30 y 40 µg de los diferentes extractos se resolvieron en geles desnaturalizantes SDS-PAGE con un gradiente del 6-12% de acrilamida. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Immobilon-P (Millipore) utilizando tampón de transferencia (20% Metanol, Tris-glicina pH 8,8) durante 1 h a 300 mA. La unión inespecífica del anticuerpo a la membrana se bloqueó con tampón PBS-Tween (0.01%) conteniendo 5% leche desnatada. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios indicados a la dilución adecuada (ver Tabla 7) durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Tras tres lavados de 5 min con PBS-Tween, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) a la dilución adecuada (ver Tabla 8), durante 45 min. Posteriormente las membranas se lavaron tres veces con PBS-Tween y las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia, usando el kit de detección *ECL chemiluminescence detection kit* (Amersham), siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los casos, los

resultados mostrados corresponden a un experimento representativo de, al menos, tres realizados.

7.5 Análisis de inmunofluorescencia y microscopía confocal

Las células se crecieron hasta alcanzar un 80% de confluencia en placas P60 sobre cristales de 10/12 mm de diámetro. Las células fueron fijadas con formaldehído al 3,7% durante 30 mins a temperatura ambiente y posteriormente se permeabilizaron con Triton X-100 0,1% (Sigma Aldrich), en PBS durante 15 min. Los cristales se incubaron con una solución de PBS con 0,1% BSA, para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos, durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente los cristales se incubaron con los anticuerpos primarios y secundarios indicados en cada caso, diluidos en PBS en atmósfera húmeda, tal como se ha descrito previamente (Moreno-Bueno et al., 2009). En los ensayos de colocalización, las células MDCK-hLOXL2-Flag se incubaron con el anticuerpo primario anti-Flag seguido del anticuerpo secundario correspondiente Alexa-Fluor 488 (verde). Tras lavados en PBS las células se incubaron con el anticuerpo anti-E2A seguido del anticuerpo secundario correspondiente Alexa-Fluor 546 (rojo). Las preparaciones se montaron en mowiol (Sigma Aldrich) y se visualizaron usando un microscopio confocal Leica TCS-SP5; las imágenes se analizaron utilizando el programa informático LAS-AF (Leica).

8. Estudios *in vivo*

8.1 Modelos animales utilizados

8.1.1 Ratón Knock-out condicional del gen *E2A*

Los experimentos de carcinogénesis química en piel mediante tratamiento con DMBA/TPA se realizaron utilizando como modelo animal de partida el ratón con delección condicional inducible de *E2A* (KO-*E2A*). Este modelo murino genéticamente modificado (cedido por el Dr. Zhuang Yuang, Department of Immunology, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA) se caracteriza por la presencia de dos sitios loxP, dianas de la recombinasa Cre, flanqueando los 4 últimos exones del locus endógeno de *E2A*, de tal manera que la eliminación de estas secuencias exónicas en presencia de Cre conduce a la generación de un transcrito truncado y por tanto a inactivación génica de *E2A* (Pan et al., 2002) (Figura 9). Para restringir la escisión del alelo condicional de *E2A* a la epidermis del ratón, este modelo se cruzó con ratones de una cepa transgénica portadora de la recombinasa Cre bajo el control de la citoqueratina epidérmica K14, K14-CreERT2 (obtenida a través del CNIO, Centro Nacional de

Investigaciones Oncológicas, Madrid) (Vasioukhin et al., 1999). En la construcción K14-ERT2 la recombinasa se encuentra fusionada en su extremo C-terminal a un análogo del receptor de estrógenos, ERT2, que posibilita además un mecanismo de acción inducible dependiente de la presencia de 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT). Tras el cruce de estas dos cepas transgénicas, se generaron ratones homocigotos silvestres ($E2A^{wt/wt}$), homocigotos transgénicos ($E2A^{flox/flox}$) y heterocigotos ($E2A^{flox/wt}$), Cre positivos y Cre negativos, que se sometieron al proceso de inactivación del gen *E2A* mediante inyección intraperitoneal de 4-OHT, tal y como se describe en el apartado 8.3. El tratamiento con 4-OHT induce la traslocación del receptor de estrógenos al núcleo de las células, lo que permite a la recombinasa Cre actuar sobre sus secuencias diana loxP presentes en el gen de *E2A*, induciendo su inactivación específicamente en la epidermis. Por lo tanto, en los ratones $E2A^{wt/flox}$ y $E2A^{flox/flox}$ expresando la recombinasa Cre (Cre^+) se obtiene la delección de uno o de los dos alelos del gen *E2A* en presencia de 4-OHT, respectivamente, mientras que en los ratones $E2A^{wt/wt}$, Cre^- y en los ratones de cualquier genotipo inyectados con vehículo, no se obtiene escisión alguna (Figura 9).

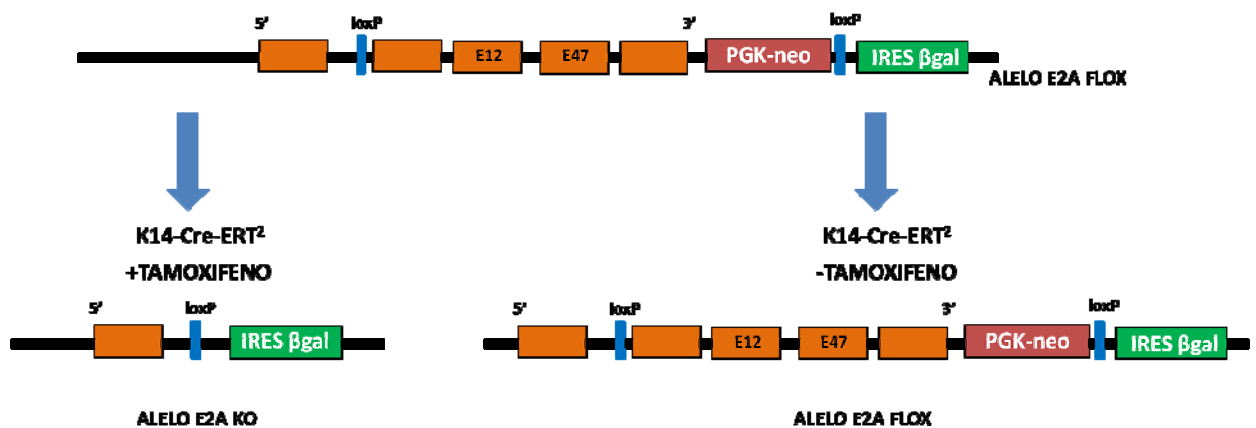


FIGURA 9: Representación esquemática del modelo del ratón KO-condicional del gen *E2A*. En este modelo, los exones 17-20 del gen *E2A* que codifican para las isoformas *E12* y *E47* están flanqueados por dos sitios *loxP*, que son reconocidos por la recombinasa Cre que se expresa bajo el promotor epidérmico K14. Por lo tanto, tras el tratamiento con 4-hidroxitamoxifeno se activa la recombinasa Cre, que determina la escisión de los exones 17 a 20 del gen *E2A* específicamente en la epidermis de la piel, mientras que el tratamiento con vehículo no produce escisión alguna.

8.1.2 Ratones C57BL/6J

Para los estudios *in vivo* sobre el papel de LOXL2 y *E47* en la regulación del nicho premetastásico se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J. Este modelo se eligió en cuanto las células Eo771 derivan de un carcinoma de mama generado en ratonas de esta misma cepa (Ewens et al., 2005), y el abordaje planteado necesita modelos que permitan estudios en ratones singénicos.

8.1.3 Ratones EGFP-C57BL/6J

Para los experimentos de trasplante de médula ósea se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J que expresan EGFP bajo el control de el promotor de beta actina (C57BL/6-TgN(ActbEGFP)1Osb/J, Jackson Laboratories).

8.2 Genotipado de ratones KO condicionales de *E2A*

Se extrajo DNA genómico de la cola de ratones de 28 días con el reactivo REExtract-N-Amp Tissue PCR kit (Sigma Aldrich), según las indicaciones del fabricante. La presencia de los alelos *Cre*, *E2AWT* y *E2AFlox* se detectó mediante PCR semi-cuantitativa a partir de 200 ng de DNA, utilizando los oligonucleótidos indicados en la Figura 10 y cuyas secuencias se recogen en la Tabla 9. Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

Alelo *Cre*:

- 5 min a 94°C
- (30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C, 1 min a 72°C) x 30 repeticiones
- 10 min a 72°C

Alelo *E2AWt*:

- 1 min a 94°C
- (1 min a 95°C , 1 min a 60°C, 3 min a 68°C) x 35 repeticiones
- 10 min a 72°C

Alelo *E2AFlox*

- 5 min a 94°C
- (30 seg a 94°C , 30 seg a 62°C, 30 seg a 72°C) x 30 repeticiones
- 7 min a 72°C

Asimismo, tras el tratamiento con 4-OHT, se extrajo DNA de la epidermis de la cola de los ratones tratados con el mismo protocolo. La eficacia del tratamiento se analizó mediante PCR, con la detección de la banda *E2AKO* en la epidermis de los ratones tratados con tamoxifeno frente a los ratones tratados con vehículo, utilizando los oligonucleótidos apropiados (Figura 10, Tabla 9) y las siguientes condiciones de PCR:

Tabla 9: Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en el genotipado de los ratones KO condicionales de *E2A*

ALELO	OLIGONUCLEÓTIDOS	SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO
<i>E2A</i>Flox	FLOX FW	GCTACCCGTGATATTGCTGAAG	~ 400 bp
	FLOX RV	GTTGAATACGCTTGAGGAGAG	
<i>E2A</i>Wt	YZ164	AAGAACGAGGCCTTCCGTGTC	~ 1,8 kb
	YZ104	ATGTGTGGTGGCCCACACTTGT	
<i>E2A</i>KO	KO FW	CCCTCAGCTCTTAATCCCTAGAC	~ 1,8 kb
	KO RV	TAACAACCCGTCGGATTCTC	
CRE	CRE FW	GCCTGCATTACCGGTCGATGC	~ 481pb
	CRE RV	CAGGGTGTATAAGCAATCCCC	

Alelo *E2A*KO:

- 1 min a 94°C
- (30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C, 3 min a 68°C) x 35 repeticiones
- 10' a 72°C

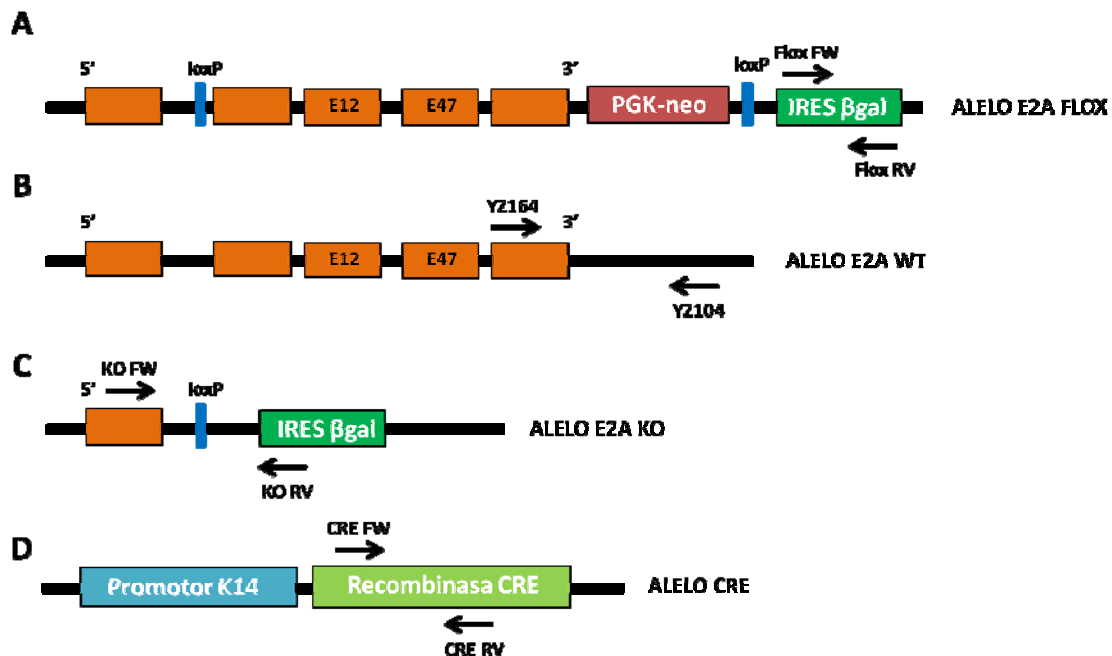


FIGURA 10: Representación esquemática de los sitios de anillamiento de los oligonucleótidos empleados para el genotipado de ratones *E2A*-K14Cre ERT². (A) El alelo *E2A*Flox se detectó utilizando la pareja de oligonucleótidos FloxFW/FloxFV; (B) la presencia del alelo silvestre (*WT*) se detectó con los oligonucleótidos YZ164/YZ104; (C) el alelo *E2A*KO se detectó usando los oligonucleótidos KOFW/KORV. (D) La presencia de la recombinasa Cre se detectó usando la pareja de oligonucleótidos CreFW/CreRV.

8.3 Tratamiento con 4-hirdotsitamoxifeno (4-OHT)

El 4-OHT tiene una estructura química de tipo esteroide, por lo que únicamente es soluble en solventes orgánicos (acetona, etanol, cloroformo), pero estos medios no pueden ser empleados como vehículos para la administración intraperitoneal del compuesto, debido a los importantes efectos tóxicos que desencadenan. Así, para la administración del agente 4-OHT recurrimos a la preparación de una suspensión del mismo en aceite de girasol, tal como se ha descrito previamente (Malanchi et al., 2008; Puyol et al., 2010). Se resuspendió 1 mg de 4-OHT (Sigma Aldrich) en 100 µl de etanol 100% (10 mg/mL) y para cada tratamiento se diluyó el stock 1:10 en aceite de girasol (Koipesol) (concentración final 1mg/mL). Para el tratamiento los animales recibieron vía inyección intraperitoneal una cantidad total de 0,3 mg de 4-OHT repartida en 3 inyecciones, (0,1mg/inyección) durante 3 días seguidos. Los grupos control de animales problema se trataron de la misma manera que los anteriores pero con solo aceite de girasol (vehículo).

8.4 Carcinogénesis química en piel

Para estos experimentos se utilizaron animales transgénicos $E2A^{flox/flox}$, $E2A^{wt/flox}$ y $E2A^{wt/wt}$ Cre^{+} y Cre^{-} de edad comprendida entre 8 y 12 semanas, sometidos al protocolo de carcinogénesis experimental DMBA-TPA como está descrito (Yuspa et al., 1996). Brevemente, los ratones fueron afeitados 24 h antes de iniciar el tratamiento de forma tópica con una única dosis del carcinógeno 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) seguida de dos dosis por semana durante 16-20 semanas del éster de forbol 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Una vez por semana se examinó detenidamente la piel de los animales midiendo con un calibre cada una de las lesiones cutáneas observadas, hasta el final del experimento. Tras el sacrificio de los animales se tomaron muestras de las lesiones inducidas y de todos los órganos.

8.5 Ensayo de tumorigenicidad en la glándula mamaria y metástasis espontánea

1×10^6 células Eo771-Luc-mCherry (parentales, pooles o los clones interferidos indicados) se inyectaron en la quinta glándula mamaria de ratonas C57Bl/6J de entre 8 y 10 semanas de edad. El crecimiento del tumor primario fue monitorizado a 7 y 14 días post-inyección (p.i) y hasta el momento del sacrificio de los ratones (24 días p.i.) mediante bioluminiscencia. Los análisis de imagen *in vivo* se realizaron utilizando el equipo IVIS Spectrum system (Caliper, Xenogen). Para ello, los animales se anestesiaron con una mezcla de isoflurano/oxígeno y se inyectaron retro-orbitalmente con 100 µl una solución de D-luciferina (50 mg/Kg in PBS). Al momento del sacrificio los animales se inyectaron con la misma dosis de D-luciferina y se

sacrificaron en el momento para la extracción de diferentes órganos (pulmón, hueso, hígado, cerebro), analizándose la actividad luciferasa de dichos órganos *ex vivo*.

8.6 Ensayo de metástasis experimental

1×10^5 células Eo771-mCherryLuc (parentales, pooles o clones interferidos) se inyectaron en la vena de la cola de ratones C57Bl/6J. Las células inyectadas se monitorizaron cada semana para estudiar el patrón de anidamiento y desarrollo de las metástasis, mediante análisis de imagen *in vivo* utilizando el equipo IVIS Spectrum system (Caliper, Xenogen) tal como se ha descrito en el apartado anterior. Los animales se sacrificaron a las 4 semanas de la inyección, recogiendo los pulmones que fueron analizados *ex vivo* para la detección de luminiscencia como se describe en el apartado anterior.

8.7 Ensayo de trasplante de médula ósea

Para los experimentos de trasplante de médula se usaron células hematopoyéticas de médula ósea derivadas de fémur y tibias de ratones que expresan EGFP bajo el control del promotor ubicuo de beta actina (C57BL/6-TgN(ActbEGFP)10sb/J, Jackson Laboratories). Tras aislar las células de la médula, 5×10^6 células suspendidas en 100 μ l de PBS fueron usadas para el trasplante de médula vía inyección retro-orbital en ratones C57BL/6J que habían sido previamente irradiados a 950 Rad (Scarlett et al., 2011). Tras el trasplante, se dejó reconstituir la médula ósea EGFP positiva durante 4 semanas y posteriormente se realizaron los experimentos de tumorigénesis y metástasis, tal como se ha descrito en los apartados 8.5 y 8.6.

8.8 Análisis de citometría de flujo de muestras de pulmón y de sangre

Las muestras de pulmones se prepararon cortando los órganos y sometiéndolos a digestión con una mezcla de 4 mg/mL collagenasa-A y 20 μ g/mL DNase (Roche) durante 60 min a 37°C en agitación. Tras tres lavados de 5 min en PBS, las células se filtraron utilizando filtros de 70 μ m de poro y se resuspendieron en 1 mL de PBS.

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante extracción retro-orbital en tubos con anti-coagulante (EDTA); las células se lisaron en buffer de lisis ACK (Gibco) y se resuspendieron en 1 mL de PBS.

1×10^6 células de cada tejido se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (ver Tabla 7) durante 45 min a 4°C. Las células se lavaron tres veces en PBS y se resuspendieron en 400 μ l de PBS. La fluorescencia asociada a las diferentes poblaciones

celulares se midió utilizando el citómetro FACSCalibur y el software CellQuest (BD). Los datos se analizaron utilizando el programa FlowJo (TreeStar).

9. Procesamiento de muestras de tejidos

Las lesiones tumorales generadas por el tratamiento con DMBA/TPA se fijaron en Formol 10% (Merck), como se ha descrito previamente (Moreno-Bueno et al., 2009) y se utilizaron para la generación de bloques de parafina, como se describe en el apartado 9.1.

Los tumores primarios, los pulmones y los diferentes órganos obtenidos en los ensayos descritos en los apartados 8.5, 8.6 y 8.7 se fijaron toda la noche en una solución de fijación (2% paraformaldehído (PFA), 20% sacarosa) y al día siguiente se utilizaron para la generación de bloques de OCT, como se describe en el apartado 9.2.

9.1 Generación de bloques de parafina

Las muestras obtenidas se fijaron con formol al 10% (Merck) durante 24 h, siendo posteriormente deshidratadas en baños progresivos de 30 min en etanol al 25%, 50%, 75%, 80% y 100% y finalmente se incubaron en xilol (Merck) durante 24 h. Para la obtención de los bloques, las muestras se incluyeron en un baño de xilol:parafina (1:1) a 55°C durante 16 h, a continuación se embebieron en soportes metálicos rellenos con parafina (DC Panreac) a 55°C, y el bloque se dejó enfriar hasta su solidificación. Una vez obtenidos los bloques, se cortaron secciones de 5 µm con un micrótopo (Microtopo Rotatorio Minot, Leica), y se depositaron sobre portaobjetos (Dako) para su posterior análisis.

9.2 Generación de bloques de OCT

Los bloques de OCT se generaron utilizando "*Optimal Cutting Temperature*" medium (Takara). Tras la fijación, las muestras se incluyeron y orientaron en un soporte Tissue Teck (Dako) que se relleno con OCT. Todo el proceso se realizó en frío sobre nieve carbónica para evitar la descongelación de las muestras. Una vez obtenidos los bloques, se almacenaron a -80°C. Posteriormente se cortaron en secciones de 5 µm utilizando el criostato Reichert-Jung Cryocut 1900 (Leica) y las secciones se depositaron sobre portaobjetos (Dako) para su posterior análisis.

10. Inmunofluorescencia de tejidos

Para el análisis de los tejidos por inmunofluorescencia, las secciones de criostato, obtenidas como se describe en el apartado anterior, se permeabilizaron con una solución de Triton X-100 al 0,1% (Sigma Aldrich), en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Las

muestras se incubaron posteriormente con una solución de PBS-BSA 0,1% para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos, durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios y secundarios indicados en cada caso (Tabla 7), tal como se indica en el apartado 7.5. Las muestras se visualizaron utilizando un microscopio confocal Leica TCS-SP5; las imágenes se analizaron utilizando el programa informático LAS-AF (Leica).

11. Tinción con Hematoxilina/Eosina (H&E)

Las secciones de tejido se desparafinaron con xilol (20 min), se rehidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 95%, 80%, 70%, 50%) y finalmente en agua destilada. Las muestras se tiñeron con hematoxilina (DC Panreac) durante 5 min a temperatura ambiente y el exceso de tinción se eliminó con 3 lavados de 5 min en agua destilada. A continuación se llevó a cabo una contra-tinción con eosina durante 1 min a temperatura ambiente. Finalmente las muestras se deshidrataron en baños progresivos de etanol (50%, 70%, 80%, 95%, 100%) se aclararon con xilol (20 min) y se montaron con Depex (BDH Prolabo).

12. Análisis estadísticos

En todos los experimentos mostrados, para determinar el rango de significancia estadística entre los distintos tratamientos o grupos, se aplicaron las pruebas t de Student y ANOVA, utilizando para ello el programa informático GraphPad Prism versión 4.0.

RESULTADOS

1. FUNCIÓN DEL GEN *E2A* EN LA CARCINOGENÉISIS DE PIEL DE RATÓN

Para estudiar la implicación de *E2A* en el proceso de carcinogénesis utilizamos como modelo animal el ratón con delección condicional de *E2A* (KO-*E2A*). Este modelo se generó en nuestro laboratorio cruzando los ratones *E2A*^{Flox}, que llevan el gen *E2A* flanqueado por dos sitios *loxP* (cedido por el Dr. Zhuang Yuang, Department of Immunology, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA), con los ratones K14-Cre ERT², que expresan la recombinasa Cre inducible por tamoxifeno bajo el promotor específico de epidermis K14. En la progenie de dicho cruce, se generaron por lo tanto ratones homocigotos silvestres (*E2A*^{wt/wt}), homocigotos transgénicos (*E2A*^{flox/flox}) y heterocigotos (*E2A*^{flox/wt}), Cre positivos y Cre negativos, que se sometieron a proceso de delección del gen *E2A* mediante inyección intraperitoneal de 4-OHT (ver Materiales y Métodos).

Para estudiar la relación entre *E2A* y el proceso de carcinogénesis química inducida por DMBA/TPA, los ratones se trataron con una única dosis del carcinógeno Dimetil-benzamida (DMBA), seguida de dosis periódicas durante 20 semanas del éster de forbol (TPA). Dicho tratamiento se realizó antes y después de inducir la delección del gen *E2A*, y la eficacia del tratamiento con tamoxifeno se probó mediante PCR semicuantitativa, con la detección de la banda *E2A*KO en la epidermis de los ratones tratados con 4-OHT frente a los ratones tratados con vehículo (Figura 11).

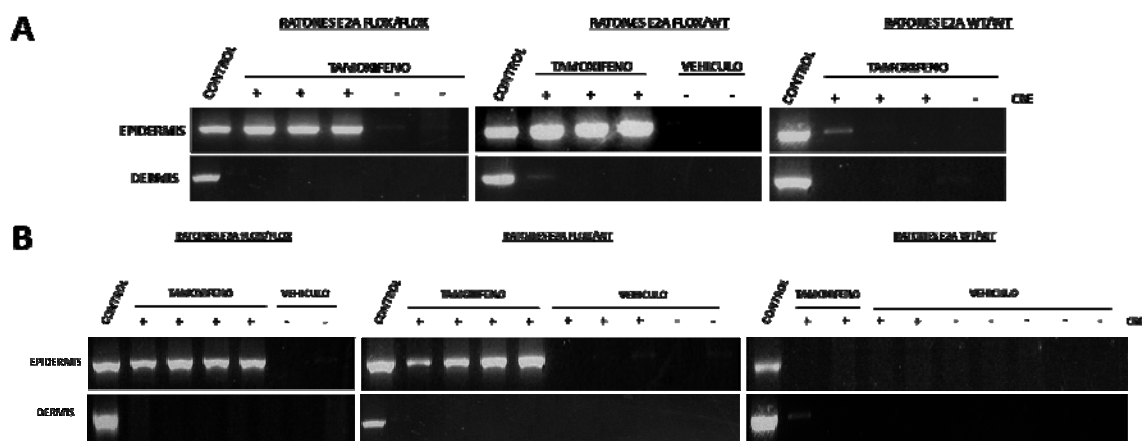


FIGURA 11: Evaluación por PCR semi-cuantitativa de la delección del gen *E2A* en ratones *E2A*-KO condicionales. A) Los ratones *E2A*^{wt/wt}, *E2A*^{wt/flox} y *E2A*^{flox/flox} se trataron con 3 dosis diarias de tamoxifeno o de vehículo a las 20 semanas tras el inicio del tratamiento con DMBA/TPA. **B)** Los ratones se trataron con 3 dosis diarias de 4-OHT o de vehículo antes de empezar el tratamiento con TPA. La banda de 1800 pb representa la banda diagnóstica de la delección de 1 o 2 alelos de *E2A*. Control: banda diagnóstica de la delección de *E2A*.

1.1. Efecto de la delección de *E2A* en la carcinogénesis química de piel de ratón

En un primer experimento piloto se analizó la posible influencia de la presencia de uno o dos alelos del gen *E2A*^{flox}, para lo que se utilizaron ratones sin tratar con 4-OHT. Como se puede observar en la figura 12, la respuesta al tratamiento con DMBA/TPA fue similar en los tres grupos de ratones analizados en cuanto a latencia, detectándose la aparición de las primeras lesiones a partir de las 11 semanas de inicio del tratamiento (Figura 12A). El número de lesiones detectadas en los ratones fue asimismo similar entre los tres grupos, y no se observaron diferencias significativas en el tamaño de las lesiones producidas entre los diferentes genotipos (Figura 12B).

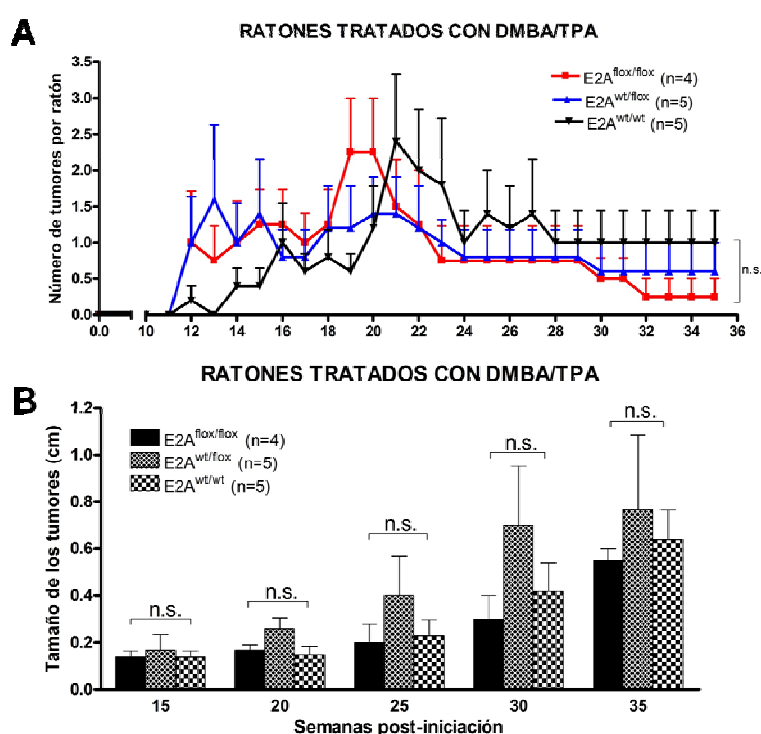


FIGURA 12: Efecto del tratamiento con DMBA/TPA en ratones *E2A*-KO condicionales. Los ratones *E2A*^{wt/wt}, *E2A*^{wt/flox} y *E2A*^{flox/flox} se sometieron al proceso de carcinogénesis química por DMBA/TPA según protocolo estándar. **(A)** Latencia de tumores inducidos en los ratones de los diferentes genotipos tratados con DMBA/TPA. Se representa el número medio de lesiones producidas por ratón de cada genotipo, **(B)** Tamaño medio de las lesiones inducidas en los ratones de los diferentes genotipos por el tratamiento con DMBA/TPA. Barra, desviación estándar de la media. n.s.= no significativo por test ANOVA. Se indica el número total de ratones tratados (n) de cada genotipo.

Dado el bajo número de lesiones generadas en estos ratones como consecuencia del tratamiento con DMBA/TPA, decidimos realizar varios cruces de la cepa original con ratones FVB, para aumentar la susceptibilidad a carcinogénesis y realizar un estudio más exhaustivo. A continuación, decidimos estudiar si la ausencia del gen *E2A* tiene algún efecto en la progresión tumoral, una vez generadas las lesiones tumorales en el proceso de carcinogénesis química en piel. Para ello, se indujo la escisión del gen *E2A* después de 20 semanas de inicio

del tratamiento con TPA, mediante inyección intraperitoneal de 4-OHT en los ratones de los distintos genotipos expresando la recombinasa Cre (Cre^+). Como se muestra en la Figura 13A, los ratones $E2A^{flox/flox}$ empezaron a desarrollar lesiones con algunas semanas de antelación con respecto a los otros dos genotipos (semana 7 frente a semana 13), aunque no hubo diferencias significativas en el número medio de tumores por ratón en los ratones $E2A^{flox/flox}$ respecto a los otros genotipos $E2A^{flox/wt}$ y $E2A^{wt/wt}$ (Figura 13A). A partir de la semana 20, se evidenció una ligera disminución del número de lesiones por ratón en los tres genotipos, tanto en los ratones tratados con tamoxifeno (Figura 13A) como en los ratones tratados con vehículo (Figura 13B), presentando al final del ensayo aproximadamente el mismo número de lesiones por ratón, con independencia del genotipo. El tratamiento con tamoxifeno tampoco afectó el tamaño de las lesiones inducidas, ya que al final del tratamiento no se apreciaron diferencias significativas entre los tres grupos (Figura 13C y 13D). Curiosamente, los ratones $E2A^{flox/wt}$ desarrollaron un número menor de lesiones comparado con los ratones $E2A^{wt/wt}$ y $E2A^{flox/flox}$, y no se notaron diferencias significativas en el número de lesiones generadas en los ratones tratados con 4-OHT frente a los tratados con vehículo (Figura 13 A y 13B).

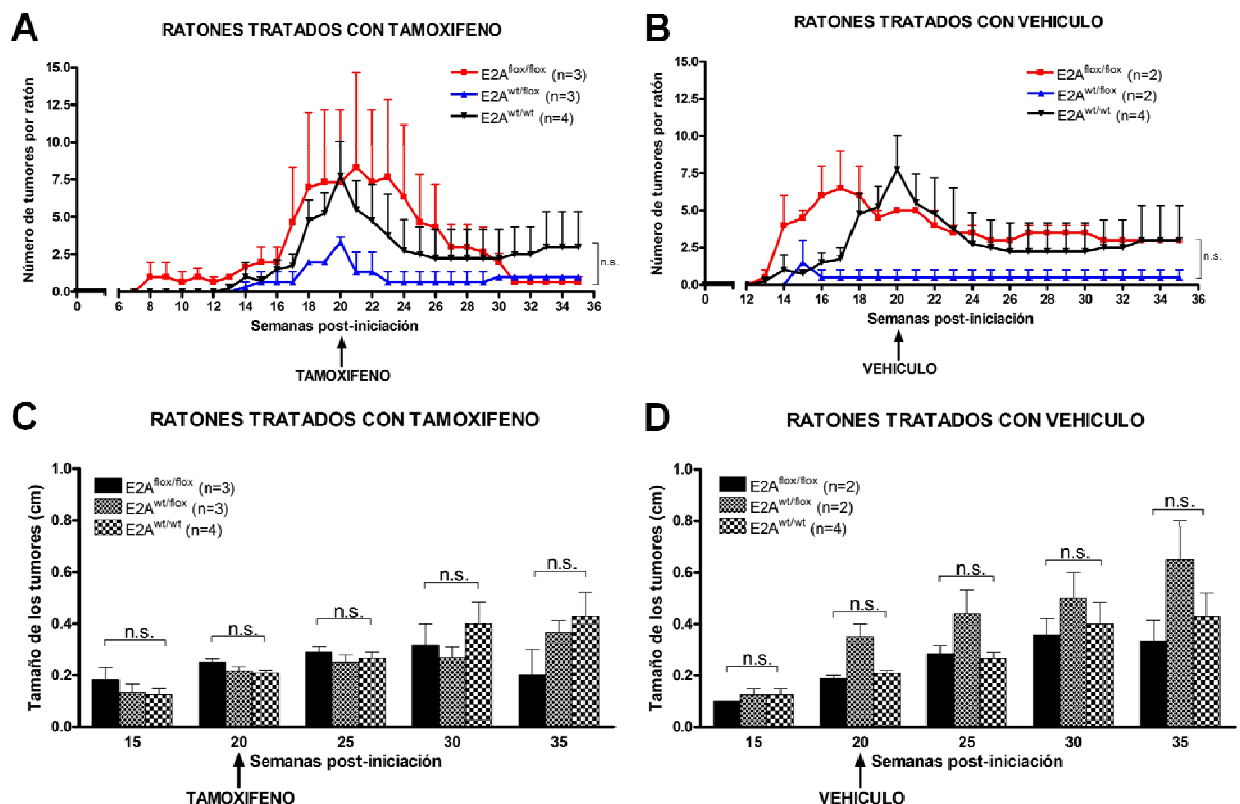


FIGURA 13: Efecto de la delección de $E2A$ tras el tratamiento con DMBA/TPA en ratones $E2A$ -KO condicionales. Los ratones $E2A^{wt/wt}$, $E2A^{wt/flox}$ y $E2A^{flox/flox}$ se sometieron al proceso de carcinogénesis química por DMBA/TPA según protocolo estándar y después se trataron con tamoxifeno o con vehículo en la semana 20 del inicio del tratamiento (flechas) para inducir la delección del gen $E2A$. (A) y (B) Latencia de los tumores inducidos en ratones tratados con tamoxifeno (A) o con vehículo (B) tras el tratamiento con DMBA/TPA. Se representa el número medio de lesiones producidas por ratón de cada genotipo. (C) y (D) Tamaño medio de las lesiones inducidas por el tratamiento con DMBA/TPA a las semanas indicadas en los ratones de los diferentes genotipos tratados con tamoxifeno (C) o con vehículo (D). Barra, desviación estándar de la media. n.s.= no significativo por test ANOVA. Se indica el número total de ratones tratados (n) de cada genotipo.

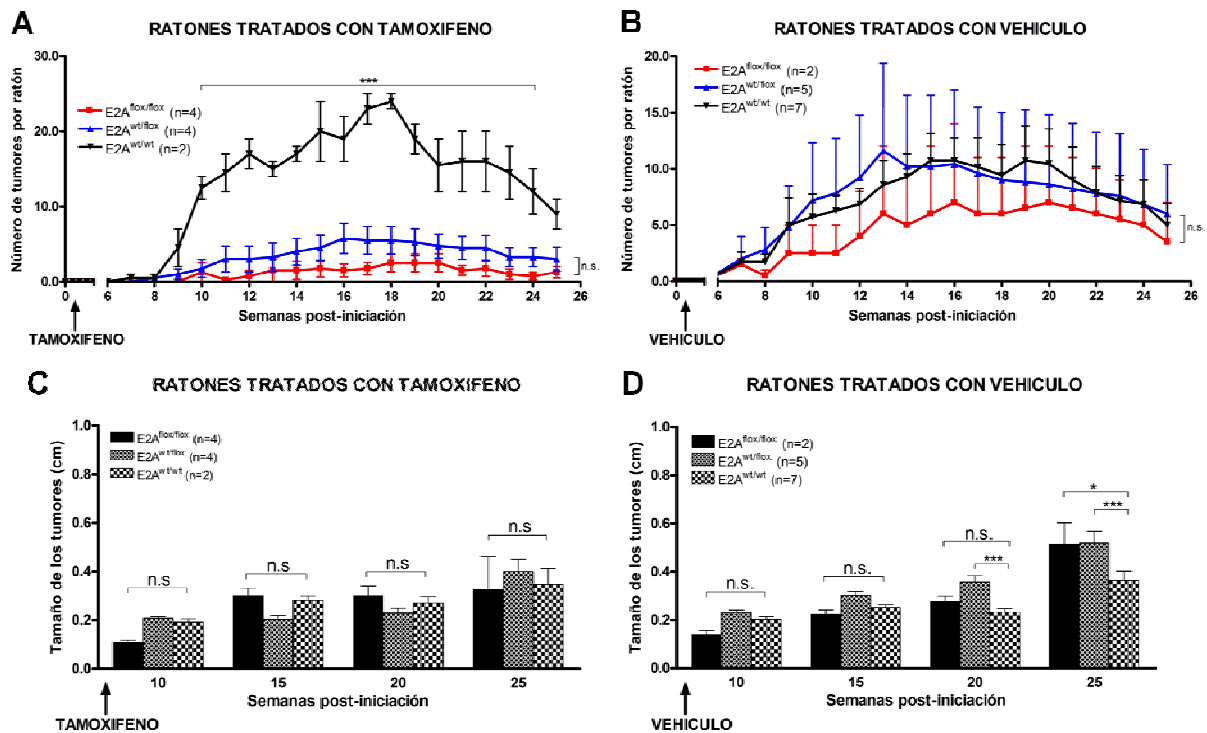


FIGURA 14: Efecto de la delección de E2A previa al tratamiento con DMBA/TPA en ratones E2A-KO condicionales. Los ratones $E2A^{wt/wt}$, $E2A^{wt/lox}$ y $E2A^{lox/lox}$ se trataron con tamoxifeno o con vehículo para inducir la delección del gen E2A después de suministrar el DMBA, antes de empezar el tratamiento con TPA. (A) y (B) Latencia de los tumores inducidos en ratones tratados con tamoxifeno (A) o con vehículo (B) antes del tratamiento con DMBA/TPA. Se representa el número medio de lesiones totales producidas por ratón de cada genotipo (C) y (D) Tamaño medio de las lesiones inducidas por el tratamiento con DMBA/TPA en los ratones de los diferentes genotipos tratados con tamoxifeno (C) o con vehículo (D). Barra, desviación estándar de la media. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, n.s.= no significativo por test ANOVA. Se indica el número total de ratones tratados (n) de cada genotipo.

A continuación, quisimos investigar los efectos de la eliminación del gen *E2A* previa al tratamiento con TPA. Para ello se trataron los ratones con 4-OHT o con vehículo después de suministrar el DMBA y antes de empezar el tratamiento con TPA. Como se muestra en la Figura 14, la respuesta al tratamiento con DMBA/TPA fue diferente como consecuencia del tratamiento con tamoxifeno en cuanto a latencia, detectándose la aparición de las primeras lesiones a partir de las 7 semanas en los ratones $E2A^{wt/wt}$, mientras que los ratones $E2A^{lox/wt}$ y $E2A^{lox/lox}$ presentaron un aumento de la latencia, apareciendo las primeras lesiones a partir de las semanas 9 y 10, respectivamente (Figura 14A). En cambio, los ratones tratados con vehículo no mostraron diferencias, apareciendo las primeras lesiones a la semana 7 en los tres grupos (Figura 14B). Una vez superada la fase de latencia, el número de lesiones presentes en los ratones $E2A^{wt/wt}$ tratados con tamoxifeno ($E2A^{+/+}$) aumentó significativamente, presentando al final del ensayo 9 lesiones por ratón frente a las 3 lesiones por ratón producidas en los ratones $E2A^{lox/wt}$ y $E2A^{lox/lox}$ tratados con tamoxifeno ($E2A^{+/-}$ y $E2A^{-/-}$, respectivamente) (Figura 14A), mientras que los ratones tratados con vehículo no mostraron diferencias significativas a lo

largo de todo el ensayo entre los tres grupos (Figura 14B). Además, la incidencia tumoral fue del 100% para los ratones $E2A^{+/+}$, mientras que en los animales $E2A^{+/-}$ y $E2A^{-/-}$ solo llegó a un 70% y con algunas semanas de retraso (datos no mostrados). En cambio, los ratones $E2A^{flox/flox}$ y $E2A^{wt/wt}$ tratados con vehículo sí llegaron a alcanzar un 100% de incidencia tumoral, aunque con 2 semanas de retraso con respecto a los ratones $E2A^{wt/wt}$ (datos no mostrados). La escisión del gen $E2A$ previa al tratamiento con TPA no tuvo ningún efecto sobre el tamaño de las lesiones producidas, ya que los animales desarrollaron lesiones del mismo tamaño independientemente del genotipo (Figura 14C). En cambio, los ratones tratados con vehículo mostraron diferencias significativas en el tamaño de las lesiones a las semanas 20 y 25, cuando los ratones $E2A^{wt/wt}$ mostraron lesiones más pequeñas que los ratones $E2A^{flox/flox}$ o $E2A^{wt/flox}$ (Figura 14D).

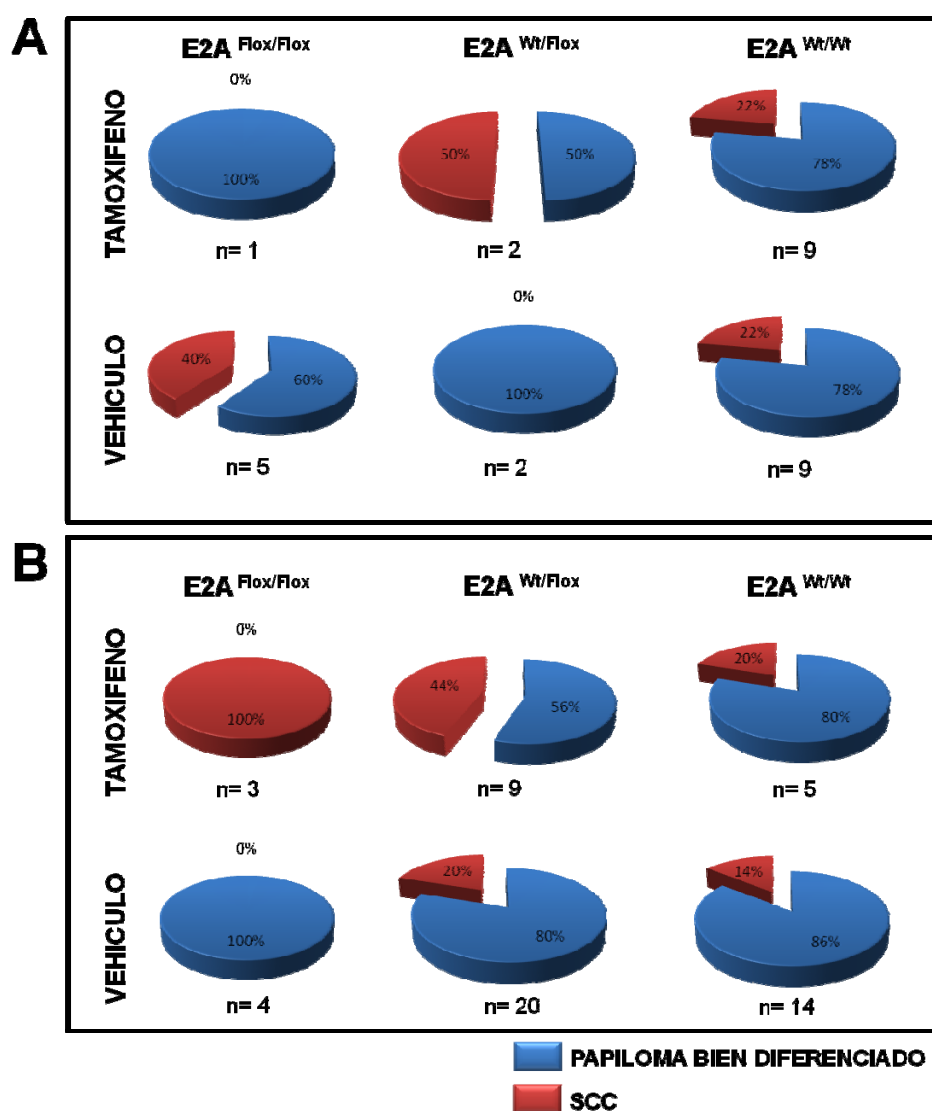


FIGURA 15: Análisis histopatológico de las lesiones producidas en los ratones $E2A$ -KO condicionales. Se indica el porcentaje de papilomas bien diferenciados (azul) y de carcinomas de células escamosas (SCC, rojo) en cada uno de los grupos analizados. **A)** Los ratones de los genotipos indicados se trataron con tamoxifeno o con vehículo para inducir la delección del gen $E2A$ tras ser sometidos al proceso de carcinogénesis química por DMBA/TPA según protocolo estándar. **B)** Los ratones de los genotipos indicados se trataron con tamoxifeno o con vehículo para inducir la delección del gen $E2A$ antes de ser sometidos al proceso de carcinogénesis química por DMBA/TPA según protocolo estándar. Se indica el número total de lesiones analizadas (n) de cada genotipo.

1.2. Análisis histológico de las lesiones generadas

El análisis histológico de las lesiones mostró que el tratamiento con DMBA/TPA en ratones sin escindir el gen *E2A* había producido solo papilomas bien diferenciados en los tres grupos estudiados ($E2A^{wt/wt}$, $E2A^{flox/wt}$ y $E2A^{flox/flox}$, datos no mostrados). Al escindir el gen *E2A* tras el tratamiento con DMBA/TPA se desarrollaron papilomas bien diferenciados en los ratones homocigotos transgénicos ($E2A^{flox/flox}$), mientras que en los ratones heterocigotos ($E2A^{wt/flox}$) y en los ratones homocigotos silvestres ($E2A^{wt/wt}$) aparecieron carcinomas (SCC) (50% y 22%, respectivamente, Figura 15A). Los ratones $E2A^{flox/flox}$ tratados con vehículo también desarrollaron un 40% de SCC y un 60% de papilomas bien diferenciados (Figura 15A), mientras que los ratones $E2A^{wt/flox}$ y $E2A^{wt/wt}$ desarrollaron principalmente papilomas bien diferenciados (Figura 15A). Sorprendentemente, cuando se indujo la delección del gen *E2A* antes del tratamiento con TPA, los ratones $E2A^{-/-}$ desarrollaron un 100% de SCC, mientras que los ratones $E2A^{flox/flox}$ tratados con vehículo desarrollaron un 100% de papilomas bien diferenciados (Figura 15B). En cambio, los ratones heterocigotos tratados con tamoxifeno desarrollaron un 44% de SCC y un 56% de papilomas, frente al 20% de SCC y al 80% de papilomas del mismo genotipo tratado con vehículo, y al 20% de SCC y 80% de papilomas de los ratones silvestres para *E2A* con ambos tratamientos (Figura 15B).

En conjunto, estos resultados indican que la delección de *E2A* inhibe el desarrollo de lesiones en la piel de ratones tratados con DMBA/TPA, mientras que parece favorecer la progresión de dichas lesiones, sugiriendo que el gen *E2A* pueda estar implicado tanto en la inducción tumoral como en la inhibición de la progresión tumoral.

2. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE E47 Y LOXL2

2.1. LOXL2 interacciona con E47 *in vivo* e *in vitro*

Estudios previos de análisis de doble híbrido realizados en el laboratorio, identificaron LOXL2 como potencial proteína de interacción con E47 (Portillo F., datos no publicados). Para confirmar la interacción entre E47 y LOXL2 detectada en el análisis de doble híbrido, se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación. Para ello, células MDCK expresando establemente la proteína de fusión EGFP-E47 (Cubillo E., 2007) se transfectaron transitoriamente con la construcción LOXL2-Flag. La inmunoprecipitación con anti-EGFP seguida del western blot con anti-LOXL2 mostró claramente la presencia de LOXL2 (tanto LOXL2-Flag como posible LOXL2 endógeno) en el inmunoprecipitado (Figura 16A, panel izquierdo). Resultados similares se obtuvieron al realizar el western blot con el anticuerpo anti-Flag (datos no mostrados). De igual forma, la inmunoprecipitación cruzada con anti-Flag

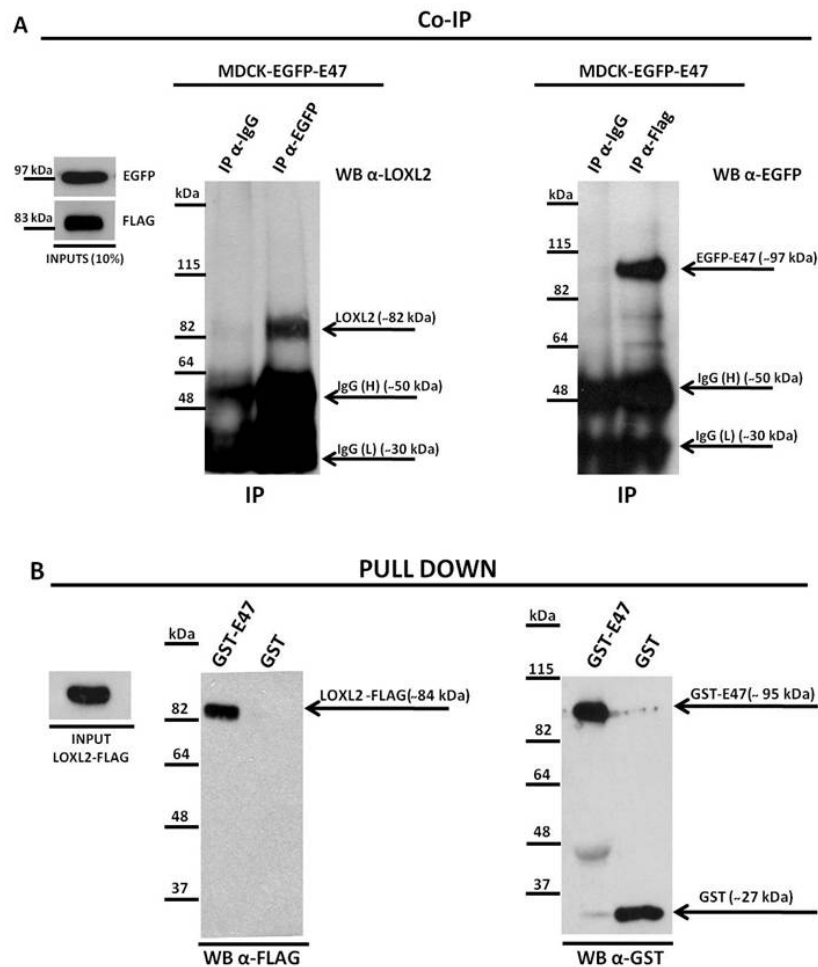


FIGURA 16: E47 interacta con LOXL2 *in vivo* e *in vitro*. **A)** Ensayos de inmunoprecipitación. Las células MDCK-EGFP-E47 fueron transfectadas transitoriamente con LOXL2-Flag y los extractos inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-EGFP (panel izquierdo) o con el anticuerpo anti-Flag (panel derecho). Los inmunoprecipitados se sometieron a western blot con los anticuerpos anti-LOXL2 y anti-EGFP, tal como se indica. En paralelo se analizaron los inmunoprecipitados obtenidos con IgG control (IP-IgG). En el panel A, en el inserto de la izquierda, se muestra la detección de EGFP-E47 y LOXL2-Flag en los extractos totales (inputs). **(B)** Ensayos de “pull down”. Las células HEK293T fueron transfectadas transitoriamente con LOXL2-Flag, y los extractos totales se incubaron con GST-E47 o GST sola. Tras la incubación, los extractos se sometieron a western blot con los anticuerpos anti-Flag (panel izquierdo) y anti-GST (panel derecho). En el panel B, en el inserto de la izquierda, se muestra la detección de LOXL2-Flag en los extractos totales (inputs). En ambos ensayos los western blot se resolvieron en geles 7,5% PAGE-SDS.

seguida del western blot con anti-EGFP confirmó la interacción entre EGFP-E47 y LOXL2 (Figura 16A, panel derecho). Estos datos se corroboraron con la realización de un ensayo de pull-down. Para ello, las células HEK293T fueron transfectadas transitoriamente con la construcción LOXL2-Flag, y los extractos totales se incubaron con la proteína de fusión (GST-E47 o GST sola) obtenida por expresión en la cepa bacteriana BL21 (ver Materiales y Métodos). Tras la incubación, el análisis de western blot con anti-GST evidenció la presencia de la proteína de fusión (Figura 16B, panel derecho), mientras el análisis con anti-Flag mostró claramente la presencia de LOXL2 unida a la proteína de fusión GST-E47 (Figura 16B, panel izquierdo). En conjunto, los datos de inmunoprecipitación y de pull-down demuestran la interacción *in vivo* e *in vitro* entre LOXL2 y E47, de forma directa o indirecta.

2.2. LOXL2 y E47 colocalizan en la zona perinuclear

Para estudiar una posible colocalización entre E47 y LOXL2, se llevaron a cabo análisis de inmunofluorescencia en el mismo modelo celular de las células MDCK expresando establemente la proteína de fusión EGFP-E47. Tras la transfección transitoria con LOXL2-Flag, el análisis mostró la expresión de LOXL2-Flag mayoritariamente en el citoplasma y en la zona perinuclear donde parece colocalizar con EGFP-E47 (Figura 17A, b,d). Por el contrario, en las células control MDCK-EGFP, LOXL2-Flag se localiza de forma dispersa por el citoplasma en la mayoría de las células (datos no mostrados). Asimismo, se analizó la localización de las proteínas E2A endógenas en las células MDCK expresando establemente la proteína LOXL2-Flag, generadas previamente en el laboratorio (Peinado et al., 2005). Los resultados obtenidos mostraron la localización perinuclear y en vesículas citoplásmicas de LOXL2 y E47/E12 (Figura 17B). En conjunto, estos resultados confirman la interacción y colocalización entre E47/E12 y LOXL2 en la zona perinuclear.

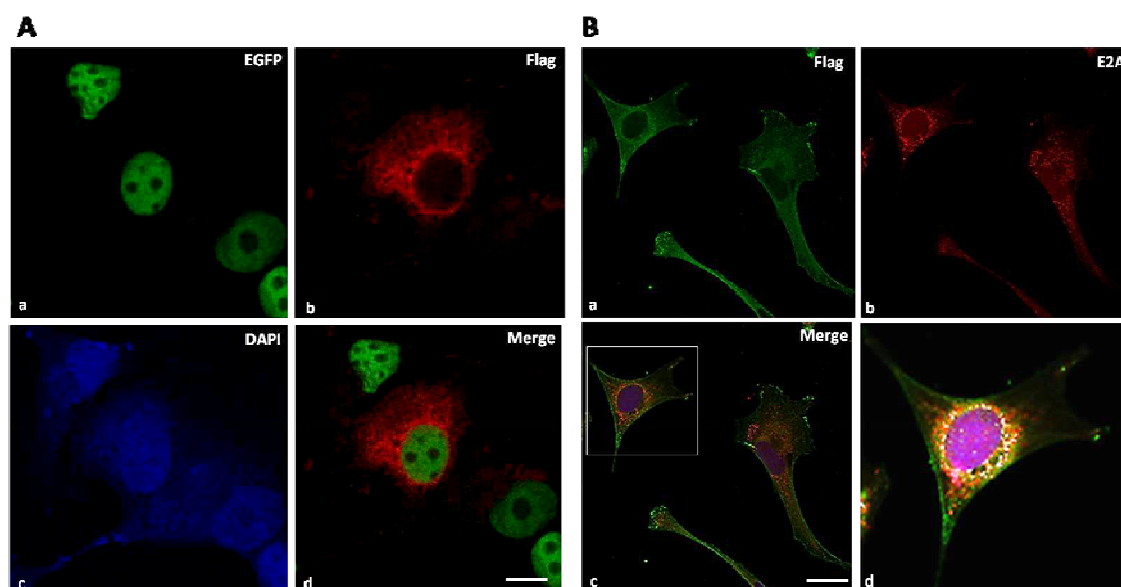


FIGURA 17: Análisis de microscopia confocal de la localización de las proteínas E47 y LOXL2. A) Las células MDCK-EGFP-E47 fueron transfectadas de manera transitoria con el vector LOXL2-Flag y analizadas por inmunofluorescencia con el anticuerpo α -Flag (b) y de forma directa para la detección de EGFP (a). B) Las células MDCK-LOXL2-Flag fueron analizadas por inmunofluorescencia con el anticuerpo α -Flag (a) y con el anticuerpo α -E2A (b). En ambos ensayos los núcleos se marcaron con DAPI (c). Las imágenes de superposición (merge) (paneles Ad, Bc, Bd) y las imágenes ampliadas de detalle (panel Bd) muestran la colocalización de LOXL2 y E47/E12 en la zona perinuclear de las células MDCK-EGFP-E47 y MDCK-LOXL2-Flag, respectivamente. Todas las imágenes originales se adquirieron con un objetivo x63.

2.3. Cooperación funcional entre E47 y LOXL2

Para analizar las consecuencias funcionales de la interacción observada entre el factor E47 y LOXL2 se llevaron a cabo ensayos de actividad promotora sobre el promotor de *cadherina-E*. Los ensayos de transfección transitoria muestran que E47 es capaz de reprimir la actividad del promotor proximal de *cadherina-E* de ratón de una forma dependiente de concentración en las células HEK293T (Figura 18A), tal como se había mostrado previamente (E. Cubillo, 2007, tesis doctoral). Además, la capacidad de represión de E47 depende de la presencia del dominio AD1 de transactivación, ya que cuando se transfectó el vector pZeoE47- Δ AD1 (Δ AD1), un mutante de E47 que carece del dominio de transactivación AD1 en la región amino-terminal, se perdió casi totalmente la capacidad represora sobre el promotor de *cadherina-E* (Figura 18A). Quisimos analizar la posible colaboración de LOXL2 en la represión del promotor de *cadherina-E* mediada por E47, mediante experimentos de co-transfección transitoria en células HEK293T. La transfección transitoria del vector de expresión de LOXL2 de ratón tuvo como consecuencia una represión parcial ($\sim 30\%$) del promotor proximal de *cadherina-E* de ratón en las células HEK293T, y pudimos observar que la cotransfección de los factores E47 y LOXL2 aumentó significativamente el efecto represor de E47 desde un 40% hasta un 70% (Figura 18B). Estos datos indican que LOXL2 colabora con el factor E47 en la

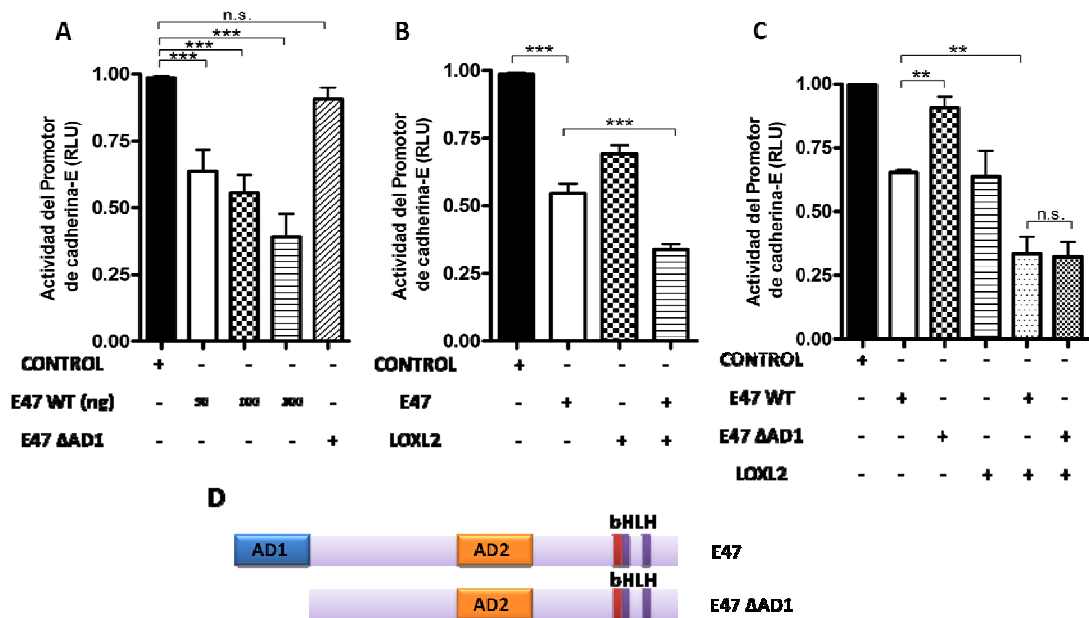


FIGURA 18: Efecto de E47 y LOXL2 sobre la actividad del promotor de *cadherina-E* en células HEK293T. A) Transfección transitoria de las cantidades indicadas de pcDNA3-mE47 WT y del vector pZeo-mE47- Δ AD1 (100 ng). **B)** Cotransfección transitoria de los vectores pcDNA3-mE47 (100 ng) y pcDNA3-mLOXL2 (50 ng). **C)** cotransfección transitoria de los vectores pcDNA3-mE47 (100 ng), pZeo-mE47- Δ AD1 (100 ng) y pcDNA3-mLOXL2 (50 ng) en las combinaciones indicadas. En todos los casos la actividad RLU se refiere a la actividad luciferasa normalizada al control en presencia de los vectores pcDNA3 o pZeo vacíos. Los resultados muestran la media de 3-4 experimentos independientes, realizados en triplicados. Barra, desviación estándar de la media.; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s.= no significativo por test t-Student. **D)** esquema de los dominios funcionales de E47 wild-type y del mutante Δ AD1.

represión del promotor de *cadherina-E*. Para estudiar más a fondo los posibles dominios de E47 implicados en la cooperación con LOXL2, decidimos utilizar el vector pZeoE47-ΔAD1 (ΔAD1) (Figura 18D) en presencia de LOXL2 (Figura 18C). Sorprendentemente, a pesar de carecer de actividad represora sobre el promotor de *cadherina-E*, el mutante ΔAD1 mantiene la colaboración con LOXL2 en la represión del promotor de *cadherina-E* de forma similar a E47 “wild type” (Figura 18C), indicando que el efecto corepresor de LOXL2 es independiente del dominio AD1 de E47.

Datos recientes de nuestro laboratorio demostraron que la actividad represora de LOXL2 sobre algunos promotores es independiente de su actividad catalítica (Moreno-Bueno et al., 2011): por lo tanto, quisimos investigar si la corepresión ejercida por LOXL2 y E47 sobre el promotor de *cadherina-E* es dependiente de dicha actividad. Para ello, utilizamos el vector pCDNA3-mLOXL2ΔCD-Flag (ΔCD), que carece del dominio catalítico de la enzima LOXL2 (Figura 19B) (Moreno-Bueno et al., 2011). Los ensayos de actividad promotora realizados mostraron que el mutante LOXL2-ΔCD induce una represión parcial del promotor de *cadherina-E* (~ 30%), similar a la inducida por LOXL2 “wild type” (Figura 19A), confirmando que la capacidad de represión de LOXL2 es independiente de su dominio catalítico. Además, el mutante ΔCD mantiene la colaboración con E47 en la represión del promotor de *cadherina-E* de forma similar a LOXL2 “wild type” (Figura 19A), indicando que el dominio catalítico de LOXL2 no es indispensable para la colaboración con E47.

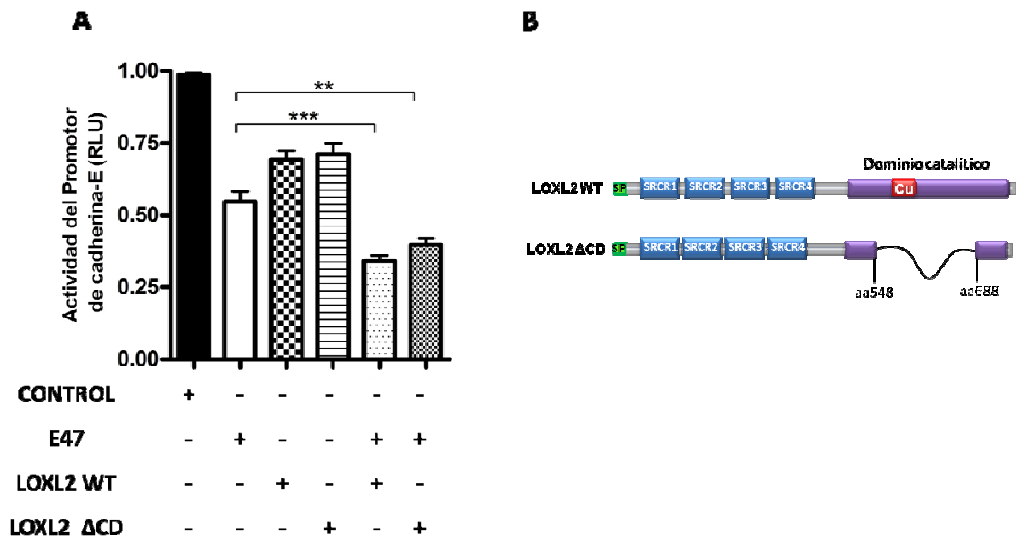


FIGURA 19: Efecto de E47 y LOXL2 WT y mutada sobre la actividad del promotor de *cadherina-E* en células HEK293T. A) Cotransfección transitoria de los vectores pcDNA3-mE47 (100 ng), pcDNA3-mLOXL2 WT (50 ng) y pcDNA3-mLOXL2ΔCD (50 ng) en las combinaciones indicadas. En todos los casos la actividad RLU se refiere a la actividad luciferasa normalizada al control en presencia del vector pcDNA3 vacío. Los resultados muestran la media de 3-4 experimentos independientes, realizados en triplicados. Barra, desviación estándar de la media. **p<0.01, ***p<0.001 por test t-Student. **B)** Esquema de la estructura y de los dominios funcionales de LOXL2 wild-type y del mutante ΔCD: SP: péptido señal, SRCR1-4: dominios scavenger ricos en cisteínas, Cu: dominio de unión al cobre. La línea continua indica los aminoácidos delecionados (aa 548 a 688) en el mutante LOXL2ΔCD.

Aparte del dominio AD1, la proteína E47 posee un dominio *Rep* de autorregulación, que se ha descrito como potente inhibidor de los dominios de transactivación AD1 y AD2 (Markus et al, 2002). El dominio *Rep* se ha descrito como muy conservado en todas las proteínas E y es especialmente rico en residuos de lisina (Markus et al, 2002), por lo que podría ser un sustrato ideal para las enzimas LOX, y específicamente para la LOXL2. Por ello, decidimos generar una serie de mutantes en los residuos de lisina del dominio *Rep* de E47, que denominamos E47-2K (mutación de 2 residuos de lisina a alaninas), E47-3K (mutación de 3 residuos de lisinas a alaninas) y E47-5K (mutación de 5 residuos de lisinas a alaninas) (Figura 20a). En los ensayos de actividad promotora realizados, estos mutantes ejercen el mismo nivel de represión que E47 “wild type” (Figura 20B), lo que indica que las diferentes mutaciones de los residuos de lisina de la región *Rep* no alteran la capacidad represora de E47 sobre el promotor de *cadherina-E*. Cuando se transfectaron en presencia de LOXL2, los mutantes 2K, 3K y 5K mostraron un nivel de corepresión ligeramente inferior, pero no estadísticamente significativo, al de E47 wild type, demostrando que dichas mutaciones no afectan significativamente a la capacidad de colaboración entre LOXL2 y E47 (Figura 20B). Además, la cotransfección de los mutantes de lisinas de E47 y del mutante LOXL2ΔCD no tuvo como consecuencia cambios significativos en el nivel de represión del promotor de *cadherina-E* (Figura 20C). Por lo tanto, se puede concluir que los residuos de lisina del dominio *Rep* de E47 no están implicados de forma importante en la colaboración entre E47 y LOXL2 en la represión del promotor de *cadherina-E*.

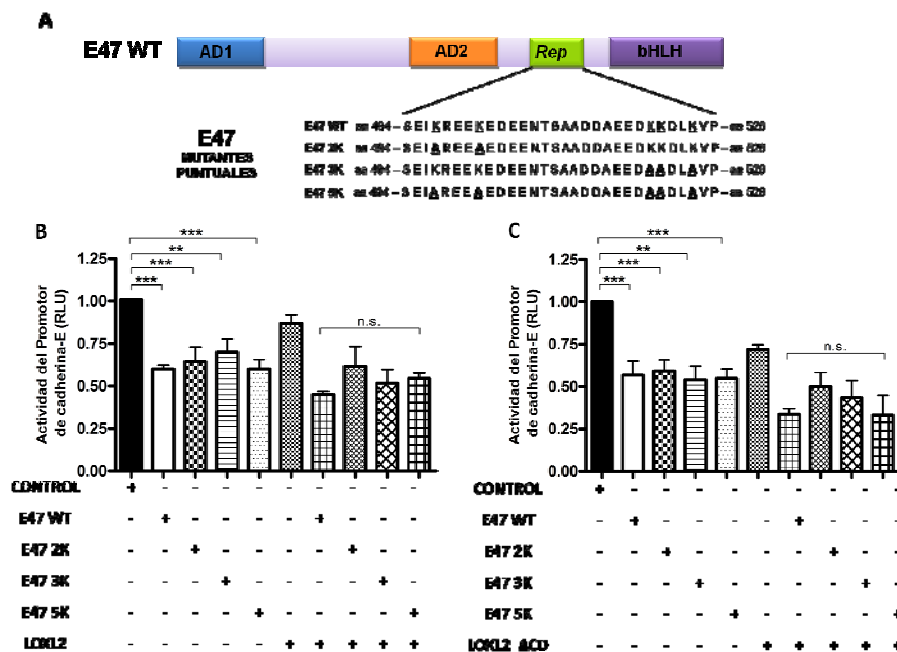


FIGURA 20: Efecto de E47 y LOXL2 (WT y formas mutantes) sobre la actividad del promotor de *cadherina-E* en células HEK293T. **A)** Esquema del dominio *Rep* de E47 y de las mutaciones puntuales generadas en los mutantes 2K, 3K y 5K. **B)** Cotransfección transitoria de los vectores pEGFP-mE47 WT (100 ng), pEGFP-mE47-2K (100 ng), pEGFP-mE47-3K (100 ng), pEGFP-mE47-5K (100 ng) y pcDNA3-mLOXL2 (50 ng) en las combinaciones indicadas. **C)** Cotransfección transitoria de los vectores pEGFP-mE47 WT (100 ng), pEGFP-mE47-2K (100 ng), pEGFP-mE47-3K (100 ng), pEGFP-mE47-5K (100 ng) y pcDNA3-mLOXL2ΔCD (50 ng) en las combinaciones indicadas. En todos los casos la actividad RLU se refiere a la actividad luciferasa normalizada al control en presencia de los vectores pcDNA3 o pEGFP vacíos. Los resultados muestran la media de 3-4 experimentos independientes, realizados en triplicados. Barra, desviación estándar de la media. **p<0.01, ***p<0.001, n.s.= no significativo por test t-Student.

Finalmente, quisimos investigar si la colaboración entre E47 y LOXL2 puede estar implicada en la regulación de otros promotores génicos como el de *claudina1* y el de *Lgl2*, recientemente caracterizados en el laboratorio como genes adicionales reprimidos por LOXL2 y Snail1 (Moreno-Bueno et al., 2011; Martínez-Estrada et al., 2007). Como se muestra en la Figura 21, E47 no es capaz de reprimir el promotor de *claudina1* (Figura 21A), pero reprime ligeramente el promotor de *Lgl2* (Figura 21B), aunque de manera no significativa. En cambio, LOXL2 tiene una elevada actividad represora sobre ambos promotores, induciendo una represión de hasta un 70%, tal y como se ha descrito en trabajos recientes de nuestro laboratorio (Moreno-Bueno et al, 2011). Los ensayos realizados en presencia de LOXL2 y E47 evidenciaron una elevada represión de la actividad de los promotores de *claudina1* (Figura 21A) y el de *Lgl2* (Figura 21B). En el caso del promotor de *claudina1* dicha represión parece estar mediada por LOXL2 y ser independiente tanto de E47 como del dominio catalítico de LOXL2 (Figura 21A). En el caso del promotor de *Lgl2*, los resultados obtenidos indican que E47 y LOXL2 podrían estar colaborando en la represión de dicho promotor, y que esta represión es asimismo independiente del dominio catalítico de LOXL2 (Figura 21B). Estos resultados confirman datos recientes de nuestro laboratorio sobre la dispensabilidad del dominio catalítico de LOXL2 en la represión de ambos promotores (Moreno-Bueno et al, 2011).

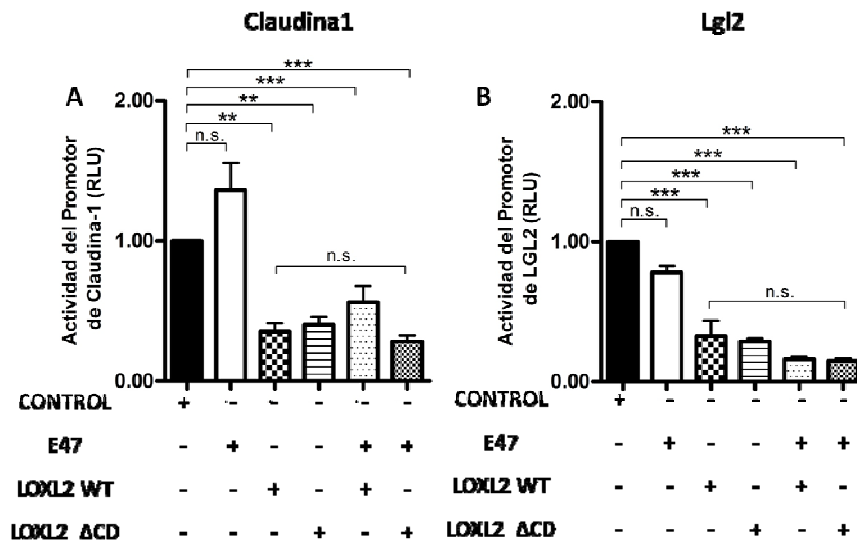


FIGURA 21: Efecto de E47 y LOXL2 sobre la actividad de los promotores de *Claudina-1* y *Lgl2* en células HEK293T. A) y B) Cotransfección transitoria de los vectores pcDNA3-mE47 (100 ng) pcDNA3-mLOXL2 WT (50 ng) y pcDNA3-mLOXL2ΔCD (50 ng) en las combinaciones indicadas sobre el promotor de Claudina-1 (A) y de Lgl2 (B). En todos los casos la actividad RLU se refiere a la actividad luciferasa normalizada al control en presencia del vector pcDNA3 vacío. Los resultados muestran la media de 3-4 experimentos independientes, realizados en triplicados. Barra, desviación estándar de la media. **p<0.01, ***p<0.001, n.s.= no significativo por test t-Student.

3. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE E47 Y LOXL2 EN LA FORMACIÓN Y REGULACIÓN DEL NICHOS PRE-METASTÁSICO.

Para estudiar el papel de E47 y LOXL2 en la regulación del nicho pre-metastásico, decidimos utilizar abordajes que permiten la utilización de modelos murinos singénicos. Por lo tanto, elegimos dos líneas celulares murinas que permitiesen dichos abordajes: células Eo771 y células 4T1. Ambas líneas derivan de adenocarcinomas de mama de ratón, generados en ratones C57Bl/6 (Eo771) y en ratones Balb/c (4T1) (Zoeten et al., 1999; Aslakson and Miller, 1992), son altamente tumorigénicas y presentan una elevada capacidad metastásica, representando por lo tanto un buen modelo para este tipo de estudios. Ambas líneas fueron cedidas por el laboratorio del Dr David Lyden (Cornell Weill Medical Center, New York, USA) y expresan establemente mCherry y Luciferasa para facilitar su detección *in vivo* (ver Materiales y Métodos para más detalles). Como se muestra en la Figura 22, la caracterización inicial de estas líneas celulares mostró que las células Eo771 expresan LOXL2 y E47, mientras que las células 4T1 solo expresan E47, no detectándose LOXL2 a nivel de mRNA ni a nivel de proteína (Figura 22A, B).

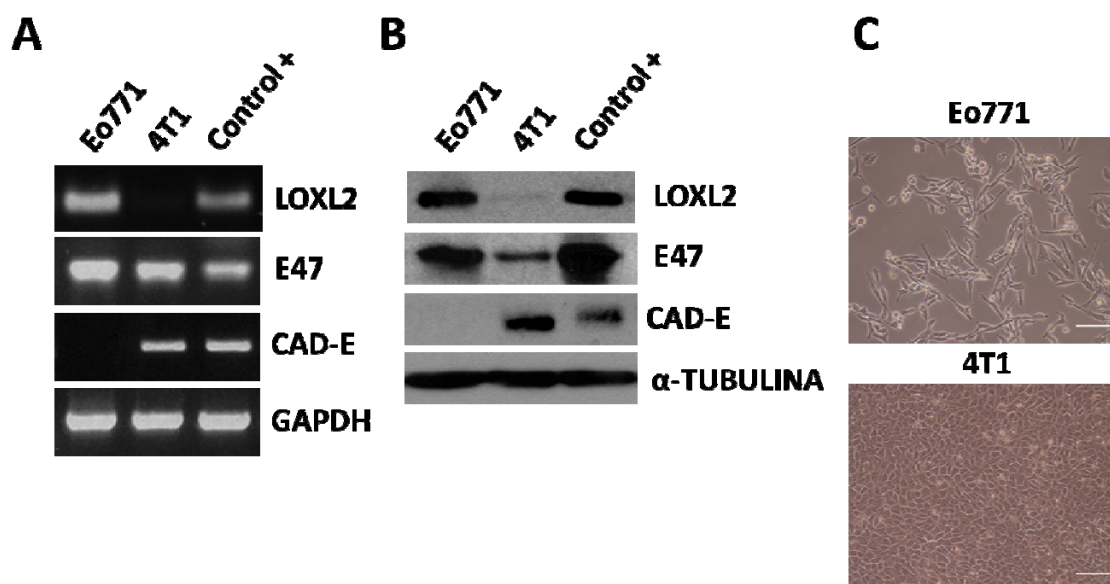


FIGURA 22: Análisis de los niveles de expresión de LOXL2, E47 y cadherina-E en las células Eo771 y 4T1. A) Análisis por PCR semi-cuantitativa de los niveles de expresión del RNA mensajero de LOXL2, E47 y cadherina-E (CAD-E) en las células Eo771 y 4T1. GAPDH se usó como control de carga. **B)** Análisis por Western blot de los niveles de expresión de las proteínas LOXL2, E47 y cadherina-E (CAD-E) en las células Eo771 y 4T1. α -tubulina se usó como control de carga. Como controles positivos (Control +) para la expresión de E47 se utilizó mRNA y extractos proteicos totales de células MDCK-E47; para la expresión de LOXL2 se utilizó mRNA y extractos proteicos totales de células MDCK-LOXL2; para la expresión de cadherina-E se utilizó mRNA y extractos proteicos totales de células MDCK WT. **C)** Imágenes de contraste de fase de cultivos celulares subconfluentes de las células Eo771 y confluentes de células 4T1. Barra: 20 μ m.

Estos análisis mostraron también que las células Eo771 no expresan cadherina-E y tienen un fenotipo típicamente mesenquimático (Figura 22C, panel superior), mientras que las células 4T1 mantienen un fenotipo epitelial (Figura 22C, panel inferior), debido probablemente a la expresión de cadherina-E (Figura 22A, B). La expresión de E47 y LOXL2 en las células Eo771 también se confirmó en análisis de inmunofluorescencia, con un patrón nuclear y/o citoplasmico, respectivamente (Figuras 24 y 25). Debido a estas características, decidimos centrar nuestros análisis en las células Eo771mCherryLuc, para poder estudiar el papel de E47 y LOXL2 en la regulación del nicho pre-metastásico mediante silenciamiento de ambas moléculas.

3.1. Silenciamiento de E47 y LOXL2 en la línea celular Eo771

Las células Eo771mCherryLuc se infectaron con lentivirus para la obtención de *pooles* y clones interferidos establemente para E47 (shE47) y para LOXL2 (shLOXL2) (ver Materiales y Métodos). Tras un análisis de los *pooles* y clones generados, decidimos utilizar los que mostraban un buen nivel de eficiencia del silenciamiento tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína: elegimos los clones shLOXL2#3, shLOXL2#8, shE47pool414 y shE47416#4.

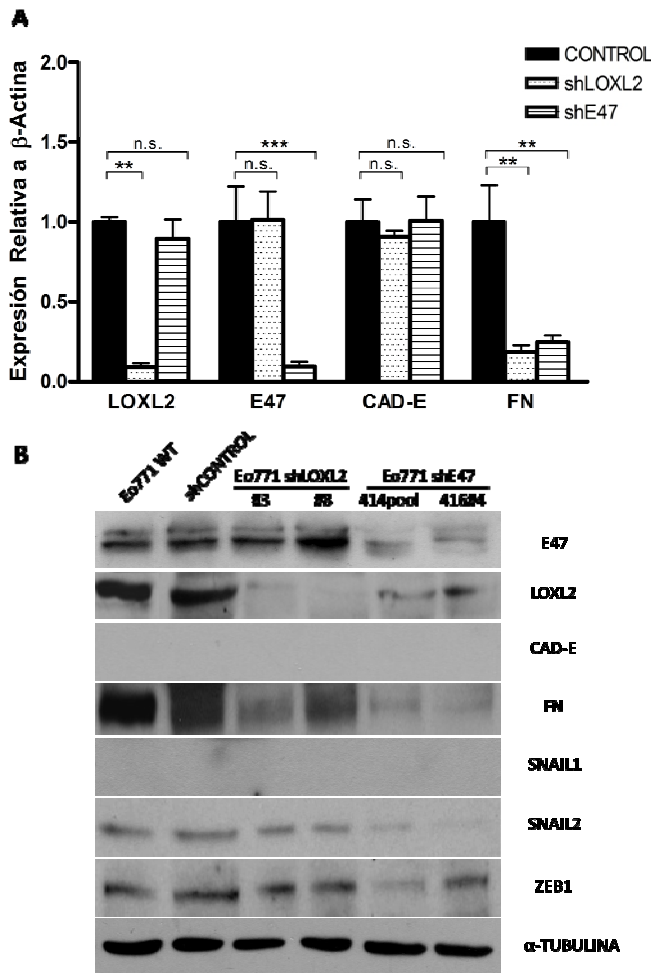


FIGURA 23: Análisis de la eficiencia del silenciamiento de LOXL2 y E47 y de los niveles de expresión de proteínas asociadas a TEM en las células Eo771. A) Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de expresión de LOXL2, E47, cadherina-E (CAD-E) y fibronectina (FN) tras la interferencia de LOXL2 o E47 frente a células infectadas con el vector control. **B)** Análisis por Western blot de factores de transcripción e inductores de TEM (E47, LOXL2, Snail1, Snail2 y Zeb1), así como de marcadores epiteliales (cadherina-E: CAD-E) o mesenquimáticos (fibronectina: FN). α -tubulina se usó como control de carga. En el panel A se muestran las medias de los valores obtenidos en los dos clones individuales shLOXL2#3 y shLOXL2#8, y con el pool shE47-414 (media \pm d.s. En el panel B se muestran los diferentes pooles o clones individuales. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n.s. = no significativo por test ANOVA.

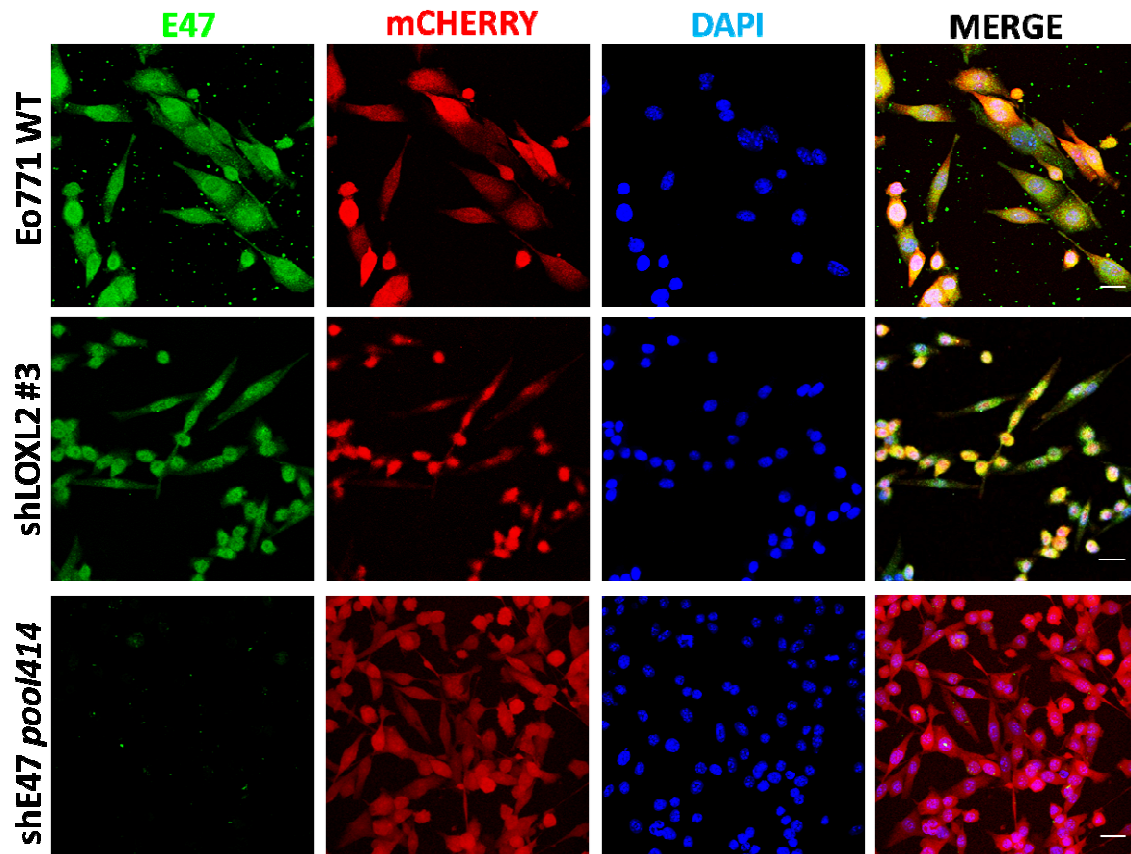


FIGURA 24: Análisis de la localización de E47 en las células Eo771-mCherry WT y en los clones interferidos –shLOXL2 y –shE47. Estudio por inmunofluorescencia de la localización de E47 endógena (paneles de la izquierda, verde) en células Eo771-mCherry WT (paneles superiores) y sus correspondientes clones interferidos para LOXL2 (#3, paneles intermedios) o E47 (pool414, paneles inferiores). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul); en los paneles de la derecha se indica la combinación de todos los marcadores (merge). E47 muestra una localización preferentemente nuclear en las células WT y shLOXL2. Barra: 20μm.

Tras la infección lentiviral, estos clones demostraron una disminución > 80% de la expresión de E47 y LOXL2 respectivamente, tanto a nivel de mRNA (Figura 23A), como de proteína analizado por Western blot (Figura 23B) y por inmunofluorescencia (Figuras 24 y 25). Además, los resultados mostraron que tras el silenciamiento de E47 la expresión de LOXL2 parece disminuir a nivel de proteína (Figura 23B) aunque los niveles de mRNA de LOXL2 se mantienen invariados respecto al control (Figura 23A). Estos resultados sugieren que la interferencia de E47 podría estar afectando a mecanismos post-traduccionales que regulan la proteína LOXL2. Tras comprobar la eficiencia del silenciamiento de E47 y LOXL2, se analizaron los niveles de expresión de algunos marcadores de TEM. Como se muestra en la Figura 23, la disminución de la expresión de E47 y de LOXL2 se acompañó a una elevada disminución de la expresión de fibronectina, tanto de mRNA (Figura 23A) como de proteína (Figura 23B), mientras que los niveles de mRNA de cadherina-E permanecieron invariados en ambos casos (Figura 23). Merece la pena indicar que los niveles basales de mRNA de cadherina-E en las células Eo771 son muy inferiores a los niveles de expresión de otros marcadores, de acuerdo con la ausencia de expresión de proteína (datos no mostrados). El silenciamiento de E47 y de LOXL2 no tuvo consecuencias en la expresión de Snail1 (Figura 23B), no detectándose expresión de este factor

a nivel de proteína en ninguna de las condiciones analizadas. Por el contrario, la interferencia de E47 resultó en una disminución de los niveles de proteína de Snail2 y de Zeb1, comparado con las células parentales (“*wild type*”: WT) o con las células interferidas con un vector control (Eo771shControl) (Figura 23B). Por su parte, el silenciamiento de LOXL2 no modificó aparentemente la expresión de Snail2 ni de Zeb1 (Figura 23B). El silenciamiento de E47 y LOXL2 no indujo re-expresión de cadherina-E (Figura 23); en concordancia, no se observaron cambios fenotípicos como consecuencia de la interferencia de E47 o de LOXL2 en las células Eo771, que mantuvieron en todos los casos un fenotipo mesenquimático (Figura 26).

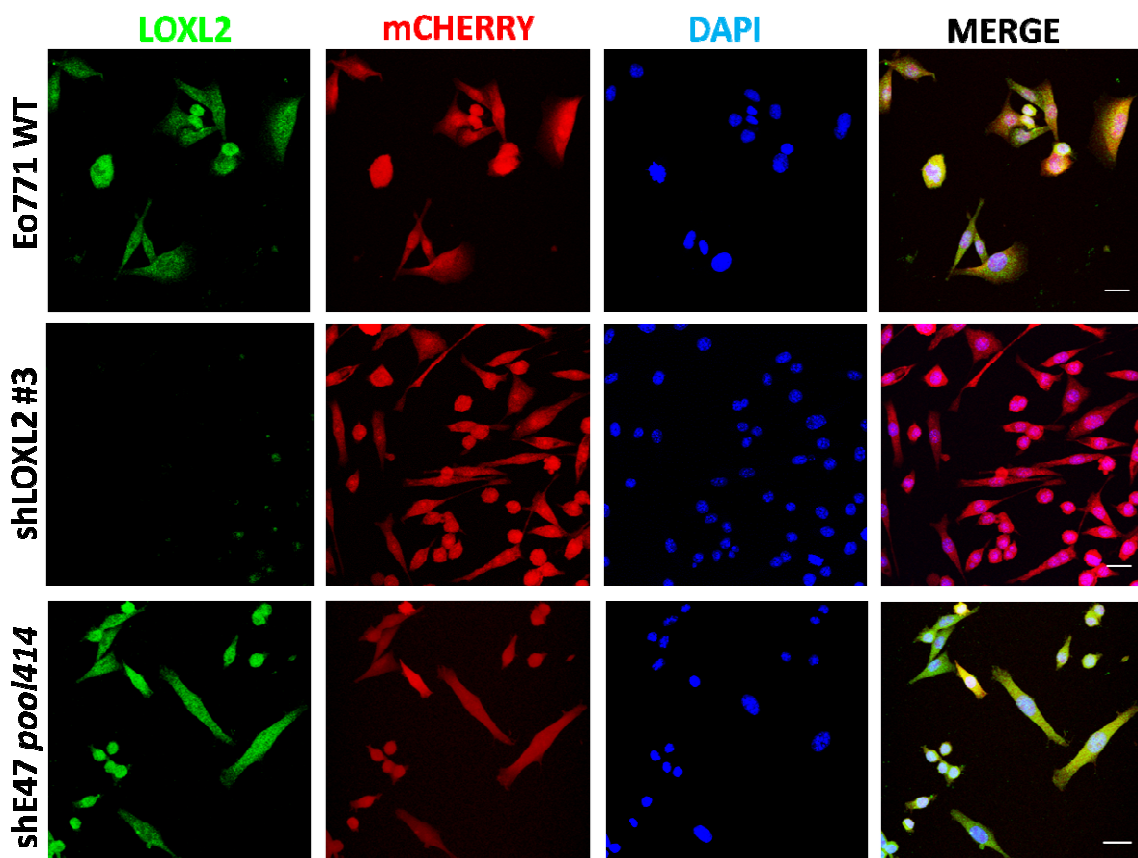


FIGURA 25: Análisis de la localización de LOXL2 en las células Eo771-mCherry WT y en los clones interferidos -shLOXL2 y -shE47. Estudio por inmunofluorescencia de la localización de LOXL2 endógena (paneles de la izquierda, verde) en células Eo771-mCherry WT (paneles superiores) y sus correspondientes clones interferidos para LOXL2 (#3, paneles intermedios) o E47 (pool424, paneles inferiores). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul); en los paneles de la derecha se indica la combinación de todos los marcadores (merge). LOXL2 muestra una localización citoplásmica y nuclear en las células WT y shE47. Barra: 20µm.

Para analizar la posible influencia del silenciamiento de ambos factores en otros miembros de la familia LOX, se estudiaron los niveles de expresión de los mismos (LOX prototípica y LOXL1-4) en las células Eo771 control (WT y shControl) y tras el silenciamiento de E47 y LOXL2 (Figura 27). El análisis por PCR cuantitativa puso de manifiesto que el silenciamiento de LOXL2 es capaz de inducir la expresión del mRNA de LOX y de LOXL3, mientras que los niveles de expresión de los otros miembros de la familia LOX no se ven afectados significativamente

(Figura 27A). De forma similar, el silenciamiento de E47 induce la expresión del mRNA de LOX, pero no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión del mRNA de LOXL3 ni de los otros miembros de la familia (Figura 27A). En contraste con la inducción observada a nivel de mRNA, no se observaron cambios aparentes en los niveles de proteína de LOX detectados en extractos totales en las células Eo771shLOXL2 ni Eo771shE47 respecto a las células control (Figura 27B, panel superior). Sin embargo el análisis por inmunofluorescencia confirmó la inducción de la expresión de LOX en los clones de Eo771 interferidos para E47 y LOXL2, donde LOX parece localizarse alrededor del núcleo de las células (Figura 28). El análisis por Western Blot confirmó la inducción de LOXL3 a nivel de proteína en las células Eo771shLOXL2 (Figura 27B, clon #3, panel intermedio) con respecto a las células control, y en menor medida en las células Eo771shE47 (Figura 27B, panel intermedio). Cuando se analizaron los niveles de LOXL2 y LOXL3 secretadas al medio condicionado (MC) se confirmó el aumento de secreción de LOXL3 en las células interferidas para LOXL2 y en menor medida para las interferidas para E47 (Figura 27C, panel inferior); sorprendentemente, no se detectó la presencia de LOXL2 en el medio condicionado de las células Eo771 WT y en ninguno de los clones analizados, indicando que estas células no secretan LOXL2 al medio condicionado (Figura 27C, panel superior).

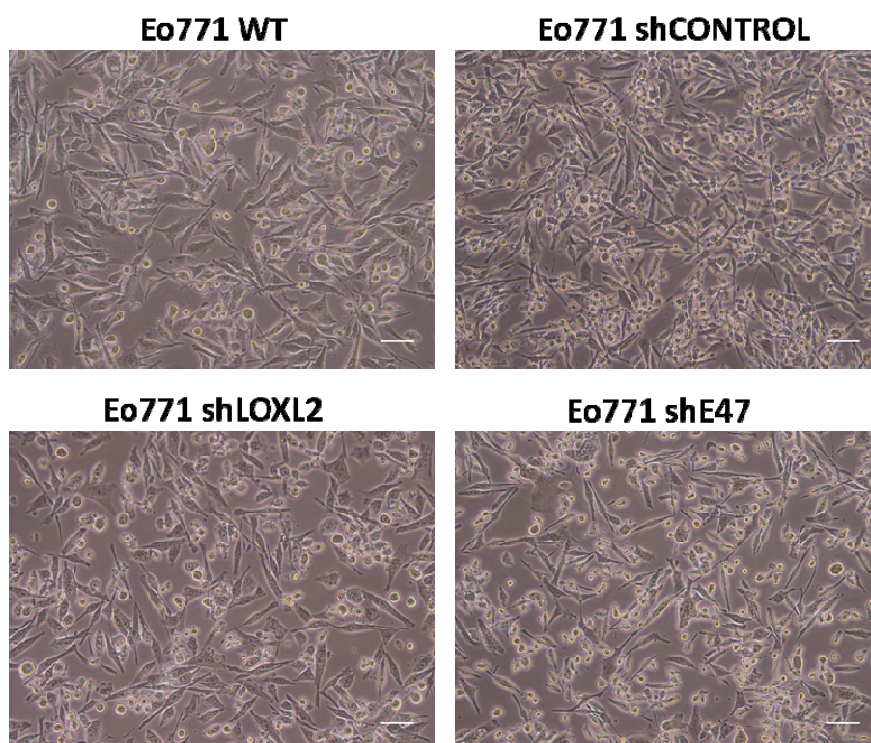


FIGURA 26: Análisis del fenotipo de las células Eo771. Imágenes de contraste de fase de cultivos celulares subconfluentes de las células Eo771mCherryLuc-WT y sus clones interferidos (shCONTROL, shLOXL2 clon #3, shE47 pool). Barra: 20µm.

En conjunto, estos resultados indican que el silenciamiento de E47 o de LOXL2 no tiene consecuencias sobre el fenotipo de las células Eo771, pero si afecta a la expresión de LOX y LOXL3 así como la de algunos marcadores de TEM, como fibronectina, o a los factores Snail2 y Zeb1 en el caso de E47.

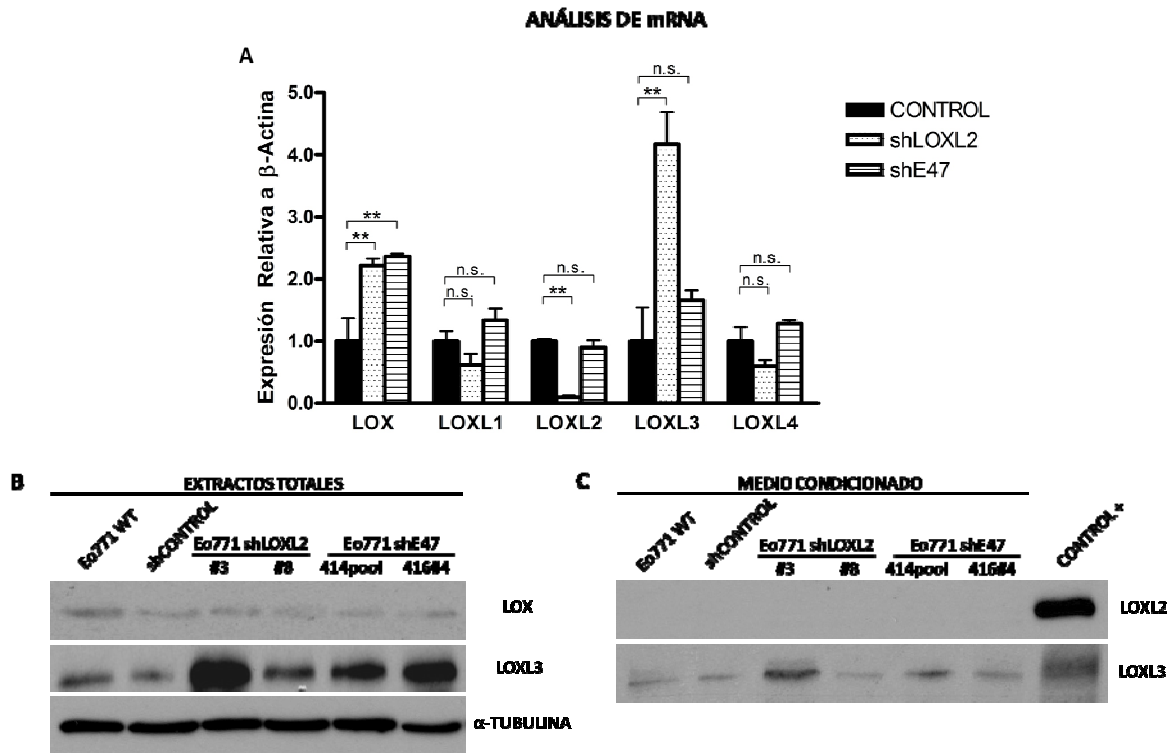


FIGURA 27: Análisis de los niveles de expresión de los miembros de la familia “Lisil Oxidasa” en las células Eo771 WT e interferidas para LOXL2 o E47. **A)** Análisis por PCR cuantitativa los niveles de expresión del RNA mensajero de todos los miembros de la familia LOX en las células Eo771shControl y en las células interferidas para LOXL2 (shLOXL2) o E47 (shE47). **B)** Análisis por western blot los niveles de expresión de las proteínas LOX y LOXL3 en los extractos totales de las células Eo771WT, shControl y clones interferidos indicados; el α-tubulina se usó como control de carga. **C)** Análisis por Western blot de los niveles de las proteínas LOXL2 y LOXL3 secretadas en el medio condicionado de las células Eo771WT, shControl y clones interferidos indicados. En el panel A se muestran las medias de los valores obtenidos en los dos clones individuales shLOXL2#3 y shLOXL2#8, y con el pool shE47-414 (media ± d.s. En el panel B se muestran los diferentes pooles o clones individuales. **p<0.01; n.s.= no significativo por test ANOVA.

3.2. Efecto del silenciamiento de E47 y LOXL2 sobre el crecimiento del tumor primario y el desarrollo de metástasis

Debido a la alta capacidad tumorigénica y metastásica de las células Eo771, quisimos estudiar en primer lugar si el silenciamiento de E47 y LOXL2 induce cambios que afectan al crecimiento del tumor primario *in vivo* en un sistema singénico. Para estos análisis decidimos utilizar los dos clones shLOXL2#3 y shLOXL2#8, y entre los clones interferidos para E47 elegimos el shE47pool414, que muestra el mismo nivel de interferencia que el clon shE47416#4 (Figura 23).

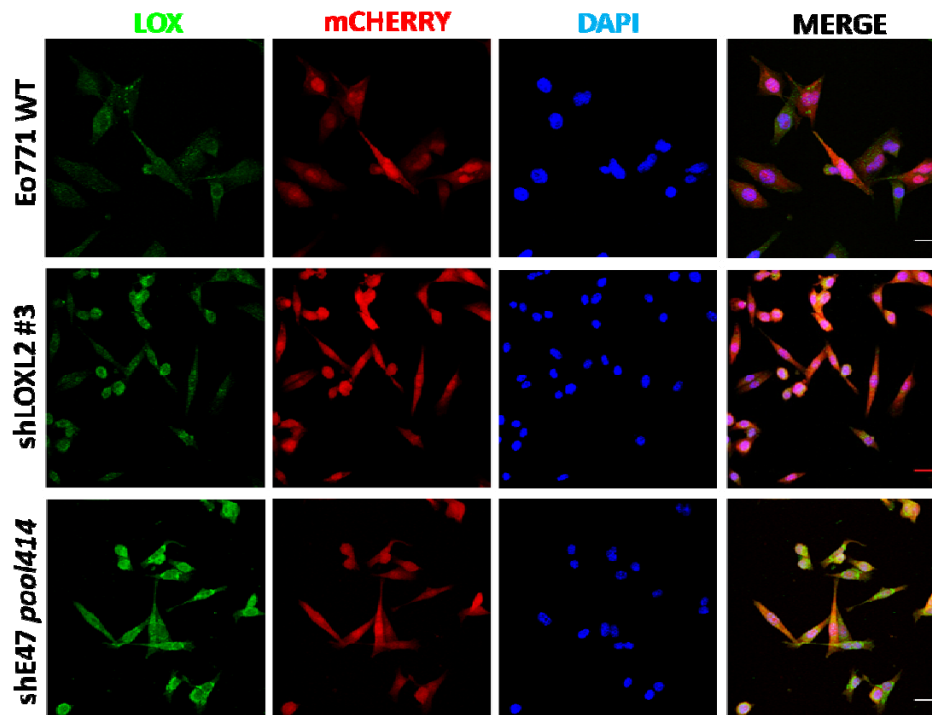


FIGURA 28: Análisis de la localización de LOX en las células Eo771-mCherry WT y en los clones interferidos shLOXL2 y shE47. Estudio por inmunofluorescencia de la localización de LOX endógena (paneles de la izquierda, verde) en células Eo771-mCherry WT (paneles superiores) y sus correspondientes clones interferidos para LOXL2 (#3, paneles intermedios) o E47 (pool414, paneles inferiores). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul); en los paneles de la derecha se indica la combinación de todos los marcadores (merge). LOX muestra una localización perinuclear en las células shLOXL2 y perinuclear y citoplásmica en las células shE47. Barra: 20µm.

Las células Eo771 control y los clones seleccionados interferidos para E47 y LOXL2 se inyectaron en la grasa de la glándula mamaria (MFP) de ratonas C57Bl/6 de entre 6 y 8 semanas de edad y el crecimiento tumoral fue monitorizado a lo largo del experimento utilizando el sistema de análisis de luciferasa *in vivo* (IVIS). Como se muestra en la Figura 29A, los tumores primarios empezaron a desarrollarse en los 3 grupos a los 7 días. El análisis a los 14 días demostró que la interferencia de LOXL2 disminuye el crecimiento tumoral de las células Eo771 con respecto a las ratonas del grupo control (Figura 29). Resultados similares se observaron en el comportamiento de las células interferidas para E47 (Figura 29). Dado el tamaño de los tumores de los ratones control, a día 24 se tuvo que interrumpir el experimento y los ratones se sacrificaron para analizar los tumores primarios y los órganos posiblemente afectados por metástasis. Como se evidencia en la gráfica de la Figura 29B, a día 24 los ratones inyectados con las células shLOXL2 y shE47 desarrollaron tumores significativamente más pequeños que los ratones inyectados con las células control, por lo que se puede concluir que el silenciamiento de E47 y de LOXL2 afecta el crecimiento del tumor primario en el modelo tumoral de las células Eo771. El análisis de diferentes órganos *ex-vivo* mostró que los ratones inyectados con las células Eo771-shControl desarrollan metástasis principalmente a pulmón (Figura 30A) y en mucho menor medida a hueso (Figura 30B). En cambio, los ratones inyectados con células Eo771shLOXL2 y Eo771shE47 muestran mucha menor capacidad de generar metástasis en pulmón, siendo este efecto más acusado en las células Eo771shLOXL2

(Figura 30A). Sorprendentemente, los ratones inyectados con células Eo771shE47 muestran un notable incremento de metástasis a hueso (Figura 30B), no observándose cambios en las metástasis óseas en los ratones inyectados con células Eo771shLOXL2 respecto a los controles. En conjunto, estos resultados demuestran que el silenciamiento de E47 y de LOXL2 ralentiza el desarrollo de metástasis pulmonares, y que el silenciamiento de E47 favorece la aparición de metástasis óseas en el modelo de las células Eo771.

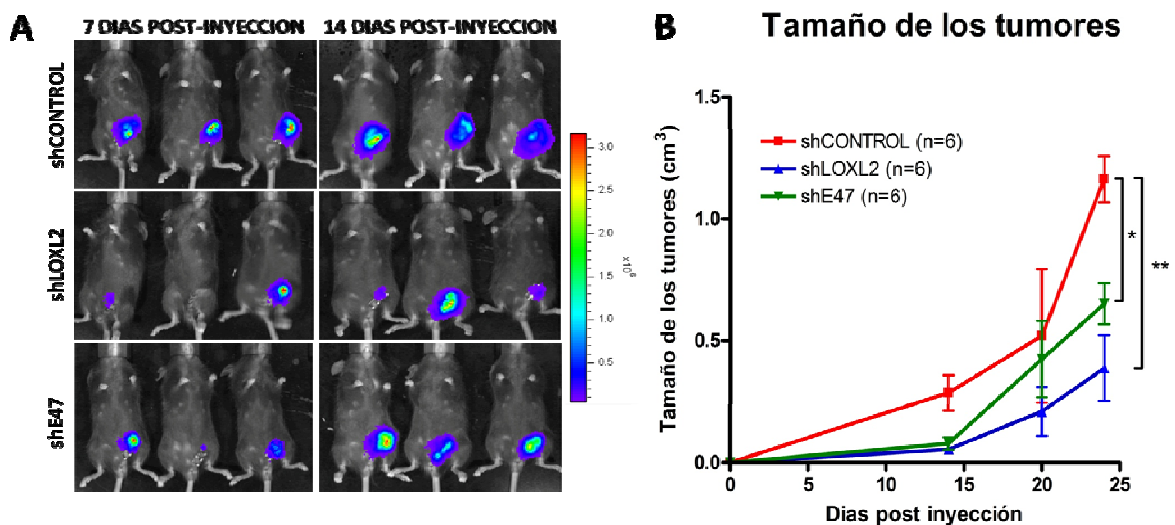


FIGURA 29: El silenciamiento de LOXL2 y de E47 disminuye el crecimiento tumoral de las células Eo771. A) Visualización mediante luminiscencia del crecimiento de los tumores primarios a 7 y 14 días post-inyección de células Eo771-shControl, Eo771-shLOXL2 y Eo771-shE47 en la glándula mamaria de ratonas C57/Bl6. Las imágenes corresponden a 3 ratonas representativas de un total de 6 animales inyectados por grupo. B) Curva de crecimiento de tumores primarios inducidos por células Eo771shControl, Eo771-shLOXL2 y Eo771-shE47 a los días post-inyección indicados. Barra, desviación estándar; *p<0.05, **p<0.01 por test ANOVA.

El efecto del silenciamiento de E47 y LOXL2 sobre la metástasis pulmonar se confirmó mediante un ensayo de metástasis experimental por inyección en la vena de la cola, que permite fundamentalmente analizar la colonización pulmonar (Figura 31). Para ello, las células Eo771shControl y los clones interferidos shLOXL2 y shE47 se inyectaron en la cola de ratones C57Bl/6 y el desarrollo de las metástasis fue monitorizado hasta las 4 semanas post-inyección utilizando el sistema de análisis de luciferasa *in vivo* (IVIS). Como se muestra en la Figura 31, los ratones inyectados con células Eo771shLOXL2 y Eo771shE47 mostraron una dramática disminución, en el caso del silenciamiento de E47, o práctica ausencia de metástasis pulmonares tras el silenciamiento de LOXL2, comparado con los ratones inyectados con células Eo771shControl. Estos resultados indican que la interferencia de LOXL2 y E47 afecta significativamente la capacidad metastásica de las células Eo771 también en ausencia de tumor primario.

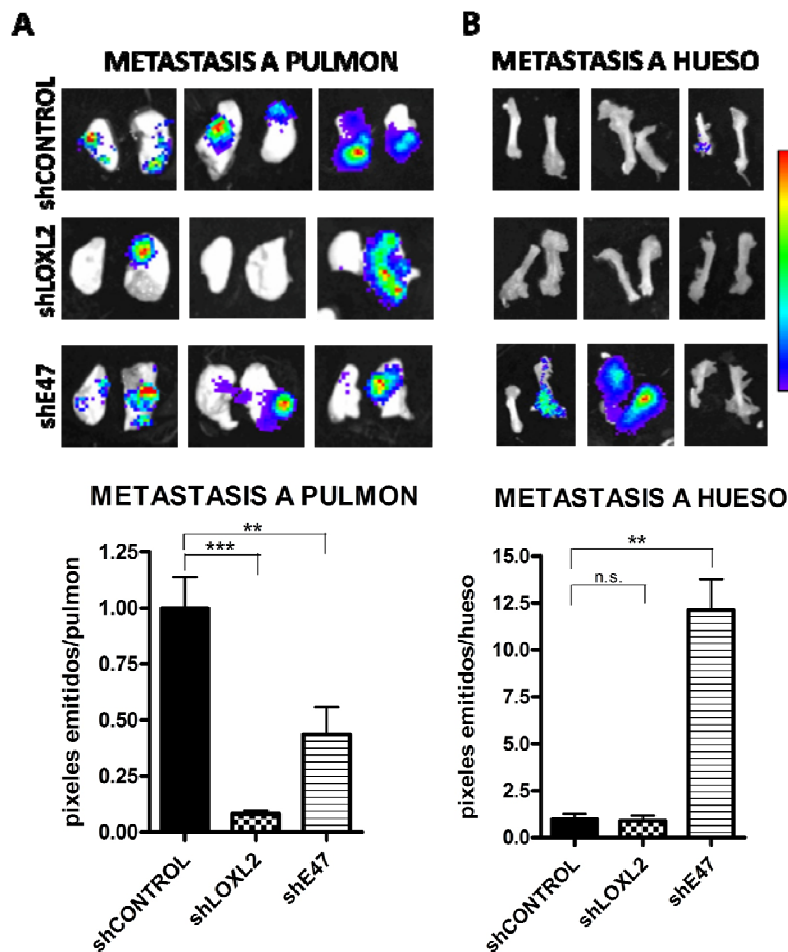


FIGURA 30: Estudio del efecto del silenciamiento de LOXL2 y de E47 en el tropismo de las metástasis. **A)** Análisis mediante luminiscencia de las lesiones metastásicas en pulmón a 24 días post-inyección en glándula mamaria de los clones indicados (paneles superiores) y cuantificación de los pixeles emitidos por los pulmones analizados (gráfica inferior). **B)** análisis mediante luminiscencia de las lesiones metastásicas en hueso a 24 días post-inyección de los clones indicados (paneles superiores) y cuantificación de los pixeles emitidos por los huesos analizados (gráfica inferior). Las imágenes de los paneles superiores muestran pulmones y huesos de 3 ratones representativos de un total de 6 animales inyectados por cada grupo. Los datos de las gráficas inferiores representan la media de todos los órganos analizados. Barra, desviación estándar; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ por test ANOVA, n.s.= no significativo.

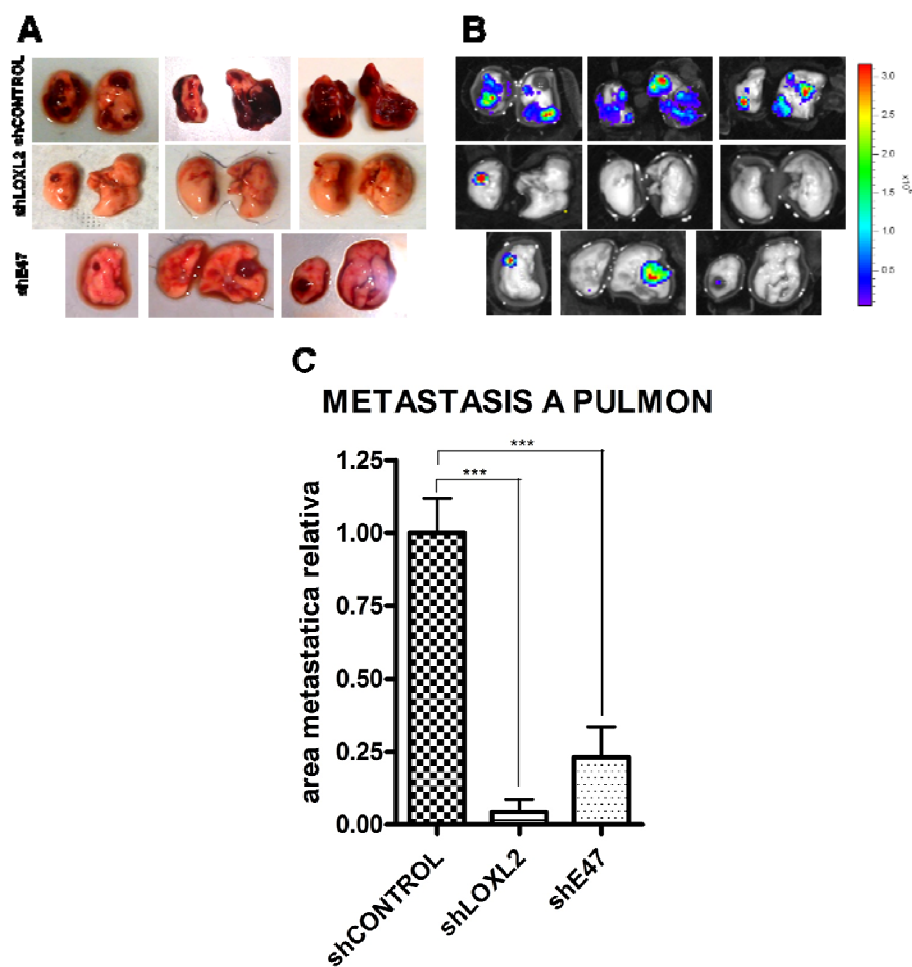


FIGURA 31: Análisis de diseminación de metástasis a pulmón tras inyección en la vena de la cola de ratones C57/B6. **A)** Imágenes representativas de las lesiones metastásicas en pulmón a 4 semanas post-inyección de los clones indicados. **B)** Análisis mediante luminiscencia de las lesiones metastásicas en pulmón a 4 semanas post-inyección de los clones indicados. Las imágenes en (A) y (B) muestran los pulmones de 3 ratones representativos de un total de 6 animales inyectados por cada grupo. **C)** Cuantificación de los pixeles emitidos por los pulmones analizados; los datos muestran la media de 12 pulmones de los 6 ratones analizados. Barra, desviación estándar; *** $p < 0.001$ por test ANOVA.

3.3. Estudio del papel de E47 y LOXL2 en la formación del nicho pre-metastásico

El dramático efecto del silenciamiento de E47 y LOXL2 en la capacidad de metástasis pulmonar nos llevó a analizar la posible influencia de ambos factores en la generación del nicho pre-metastásico, puesto que otros miembros de la familia LOX han sido implicados en este proceso (Erler et al., 2009), mientras que hasta la fecha no existen datos sobre un posible papel de E47 o de LOXL2 en la regulación del nicho pre-metastásico.

3.3.1. Efecto del silenciamiento de E47 y LOXL2 sobre el reclutamiento de poblaciones celulares de medula ósea

Para estudiar la implicación de E47 y LOXL2 en la regulación del nicho pre-metastásico, decidimos analizar en primer lugar el reclutamiento de diferentes poblaciones de medula ósea en la sangre y en los pulmones de los ratones inyectados con células Eo771WT, Eo771shControl, Eo771shLOXL2 y Eo771shE47. Para ello, analizamos los ratones a un periodo en el que el nicho pre-metastático se estuviese formando (15 días de la inyección) (Kaplan et al., 2005). Centramos nuestra atención en el análisis de varias poblaciones de células hematopoyéticas que han sido previamente implicadas en la generación del nicho metastático (precursores hematopoyéticos c-kit⁺/Sca-1⁺) (Kaplan et al., 2005) y poblaciones de células mieloides que se han visto implicadas en metástasis de mama (CD11b⁺/Gr1⁺) (Hiratsuka et al., 2006). Para ello, tras sacrificar los ratones a 15 días p.i. medimos por citometría de flujo las poblaciones de células mieloides CD11b/Gr1 positivas y de células precursoras hematopoyéticas (CPHs) c-kit/Sca-1 positivas, en la sangre y en los pulmones (Figuras 32 y 33). Los resultados obtenidos mostraron que en presencia de tumor primario generado por las células Eo771WT o Eo771shControl, los niveles de precursores mieloides (CD11b⁺/Gr1⁺) circulantes en la sangre aumentan considerablemente, pasando de un 14,50% en ratones sin inyectar a un 83% en ratones inyectados con células Eo771WT o Eo771shControl (Figura 32A, C). De manera similar, los niveles circulantes de células HPCs (c-kit⁺/Sca-1⁺) aumentaron significativamente en presencia de tumor primario generado por las células Eo771WT y Eo771shControl, con respecto a los ratones sin inyectar, pasando de un 0,58% a un 3-4% (Figura 32B, C). En presencia de tumor primario generado por los clones interferidos Eo771shE47 y Eo771 shLOXL2, los niveles circulantes de células mieloides no se vieron afectados significativamente con respecto a los tumores Eo771WT o Eo771shControl (Figura 32A, C).

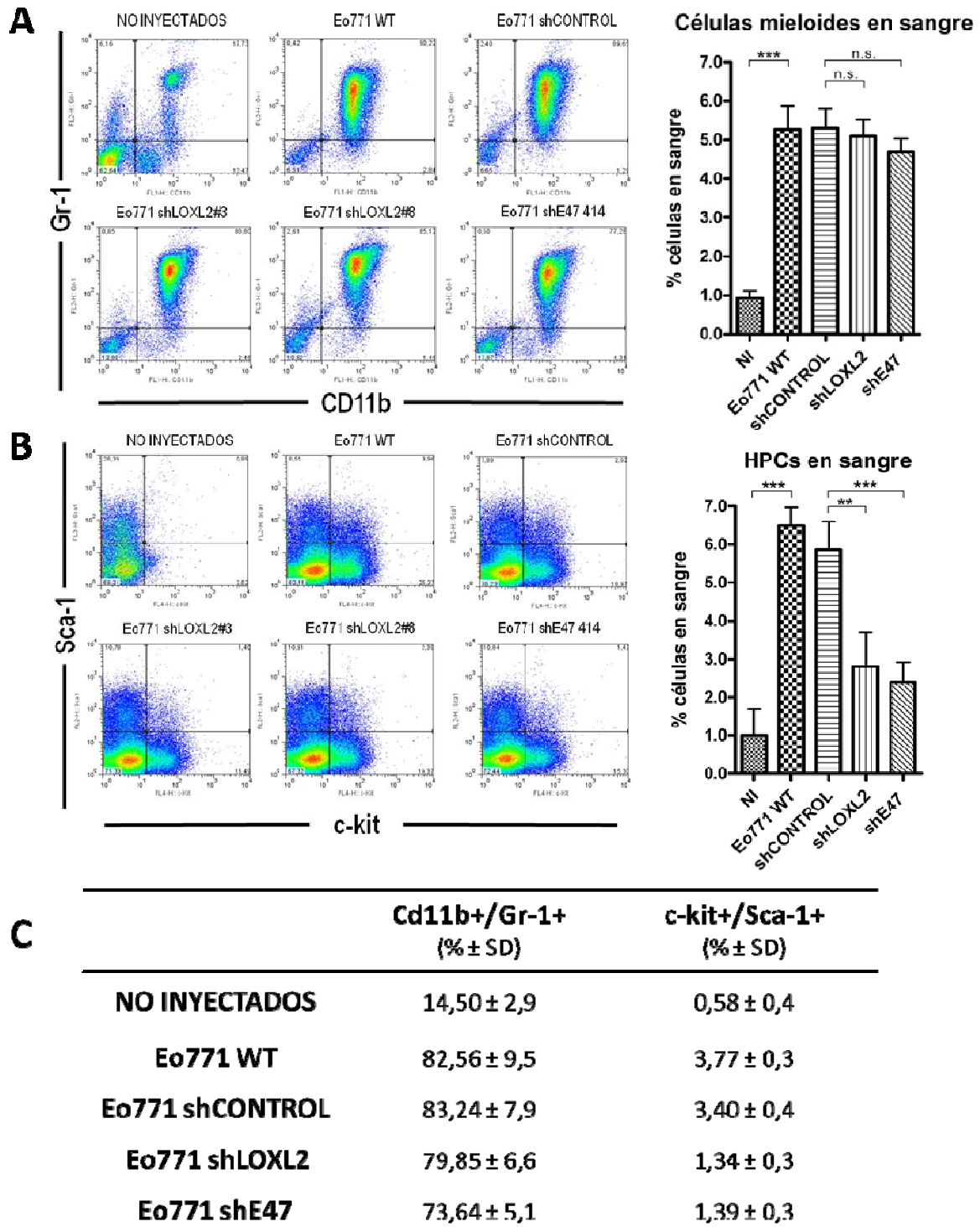


FIGURA 32: Efecto del silenciamiento de LOXL2 y de E47 en células Eo771 sobre el contenido de células mieloides y precursoras hematopoyéticas (HPCs) en sangre periférica a los 15 días después de la inyección en MFP. **A)** y **B)** Análisis por citometría de flujo de los marcadores mieloides CD11b y Gr-1 (**A**) y de células precursoras hematopoyéticas (HPCs) c-kit y Sca-1 (**B**) y su correspondiente cuantificación en la sangre de los ratones inyectados con las células Eo771 control (WT y shControl) y en los clones indicados de shLOXL2 y shE47. En las graficas se muestran los niveles relativos de células presentes con respecto a los ratones sin inyectar (NI); los datos de los ratones shLOXL2 representan la media de los valores obtenidos mediante la inyección de los clones shLOXL2#3 y shLOXL2#8. **C)** Porcentajes totales de células mieloides y CPHs en la sangre de los distintos grupos de ratones analizados. Los resultados muestran la media de dos experimentos independientes. Barras, desviación estándar; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s.= no significativo por test ANOVA.

Sin embargo, los niveles de HPCs circulantes en presencia de tumor primario generado por los clones interferidos Eo771shE47 y Eo771 shLOXL2 disminuyeron de manera muy significativa hasta alcanzar valores próximos a los detectados en la sangre de ratones sin inyectar (Figura 32B, C).

De manera importante, los resultados obtenidos en el análisis de células circulantes en la sangre se vieron reflejados en los análisis realizados en los pulmones de los mismos ratones (Figura 33). En presencia de tumor primario generado por las células Eo771WT o Eo771shControl, la infiltración de células mieloides (CD11b⁺/Gr1⁺) en el pulmón aumentó hasta casi tres veces con respecto a los ratones sin inyectar (Figura 33A, C), y se mantuvo elevada en el caso de los tumores generados por los clones interferidos Eo771shE47 y Eo771shLOXL2 (Figura 33A, C). Los niveles de células HPCs (c-kit⁺/Sca-1⁺) en los pulmones de ratones inyectados con células Eo771WT o Eo771shControl aumentaron casi tres veces con respecto a los ratones sin inyectar; sin embargo, disminuyeron significativamente en los pulmones de los ratones inyectados con células Eo771shE47 y Eo771shLOXL2 (Figura 33B, C), hasta volver a valores normales (ratones sin inyectar). En conjunto, estos datos indican que en presencia de tumor primario generado por las células Eo771WT y Eo771shControl, las células mieloides y las células HPCs se movilizan a la sangre (Figura 32) y se infiltran a los pulmones (Figura 33); sin embargo, en presencia de tumor primario generado por las células Eo771shE47 y Eo771shLOXL2 las células mieloides siguen movilizándose a la sangre (Figura 32) e infiltrándose a los pulmones (Figura 33), mientras que las células HPCs son incapaces de movilizarse a la sangre y de infiltrarse a los pulmones (Figuras 32 y 33). Por lo tanto, se puede concluir que E47 y LOXL2 se requieren para la movilización de las células HPCs pero no de las células mieloides, en la regulación del nicho premetastásico en el modelo de las células Eo771.

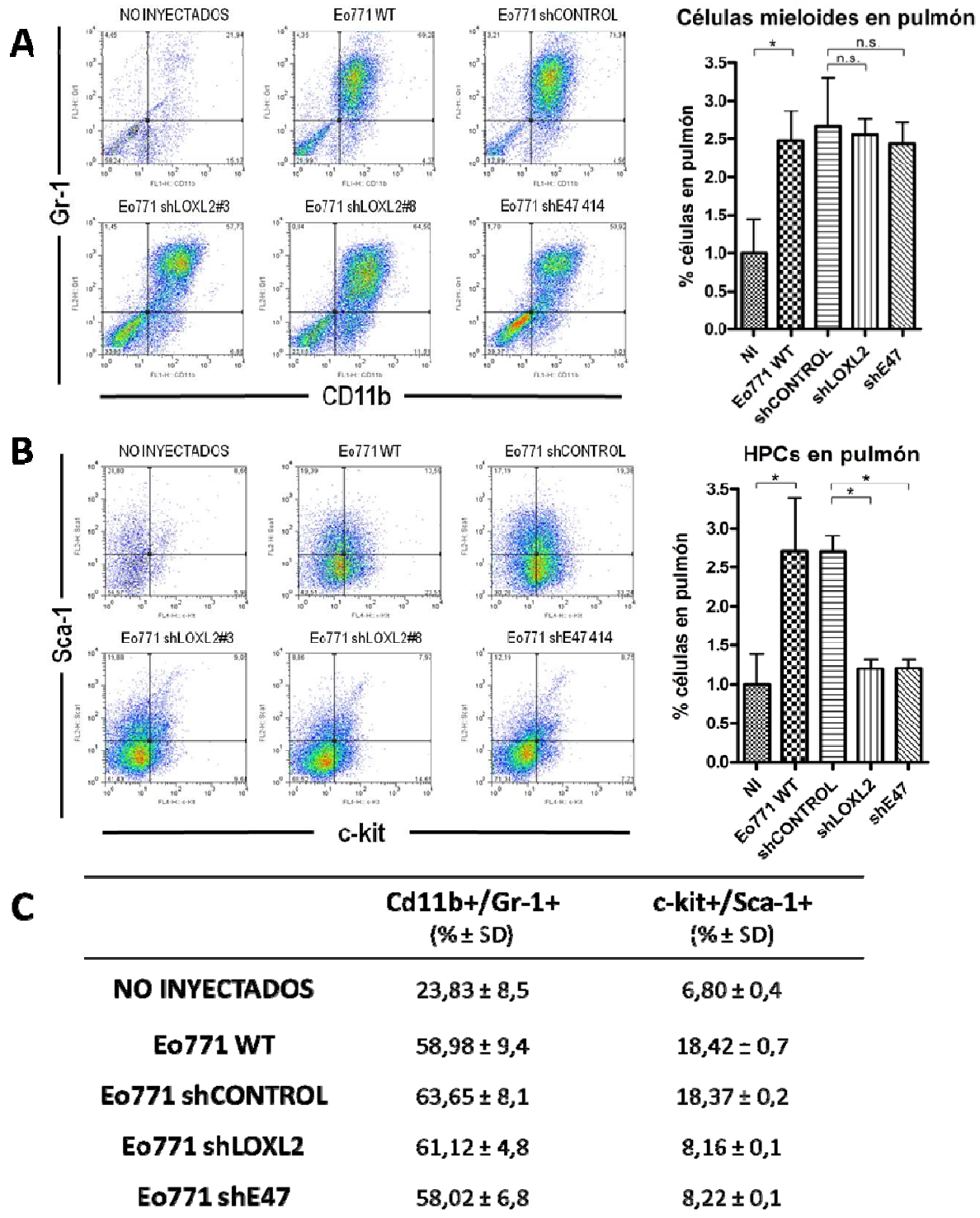


FIGURA 33: Efecto del silenciamiento de LOXL2 y de E47 en células Eo771 sobre el reclutamiento a pulmón de células mieloides y precursoras hematopoyéticas (HPCs) en ratones C57/Bl6 15 días después de la inyección en mama. A) y B) Análisis por citometría de flujo de los marcadores mieloides CD11b y Gr-1 (A) y de los marcadores de células precursoras hematopoyéticas (HPCs) c-kit y Sca-1 (B) y su correspondiente cuantificación en los pulmones de ratones inyectados con las células Eo771 control (WT y shControl) y en los clones indicados de shLOXL2 y shE47. En las gráficas se muestran los niveles relativos de células presentes con respecto a los ratones sin inyectar (NI); los datos de los ratones shLOXL2 representan la media de los valores obtenidos mediante la inyección de los clones shLOXL2#3 y shLOXL2#8. (C) Porcentajes totales de células mieloides y HPCs en el pulmón de los distintos grupos analizados. Los resultados muestran la media de dos experimentos independientes. Barras, desviación estándar; *p<0.05, n.s.= no significativo por test ANOVA.

3.3.2. Análisis de la infiltración pulmonar de células de la médula ósea

Para confirmar los resultados obtenidos en los análisis anteriores de citometría de flujo y poder visualizar la células hematopoyéticas en los pulmones de los ratones, decidimos inyectar las células Eo771WT y sus clones interferidos en la glándula mamaria de ratones que habían sido previamente trasplantados con células de medula ósea GFP-positiva (ver Materiales y Métodos). Este tipo de experimento permite seguir la movilización y reclutamiento de células de la medula ósea GFP⁺ a los órganos metastáticos (Kaplan et al., 2005). A los 15 días p.i. los ratones se sacrificaron y los pulmones se analizaron por inmunofluorescencia para estudiar el nivel de infiltración de las células hematopoyéticas (GFP⁺) y la presencia de células Eo771 metastáticas (mCherry⁺). Como se muestra en la Figura 34, y como cabe esperar, los pulmones de los ratones sin inyectar no mostraron reclutamiento de células GFP⁺ ni de células mCherry⁺ en los pulmones (Figura 34Aa-c, 34B). Al contrario, los pulmones de los ratones inyectados con células Eo771WT o Eo771shControl evidenciaron un elevado nivel de infiltración de células GFP⁺ provenientes de la medula ósea (Figura 34Ae, i, 34B); además mostraron grupos de células mCherry⁺ formando clústeres y colocalizando con células GFP⁺ (Figura 34Ad,f,g,h,j,k, 34B). En cambio, los pulmones de los ratones inyectados con células Eo771shE47 y Eo771shLOXL2 mostraron un nivel de infiltración de células GFP⁺ mucho más bajo que los ratones inyectados con células Eo771WT y Eo771shControl (Figura 34Am, q, 34B) y apenas se detectaron células mCherry⁺ (Figura 34Al,n,o,p,r,s, 34B). En conjunto, estos datos corroboran los datos de citometría de flujo y demuestran la implicación de E47 y LOXL2 en el reclutamiento de células de la medula ósea al pulmón y la formación de micrometástasis en el modelo tumoral de las células Eo771.

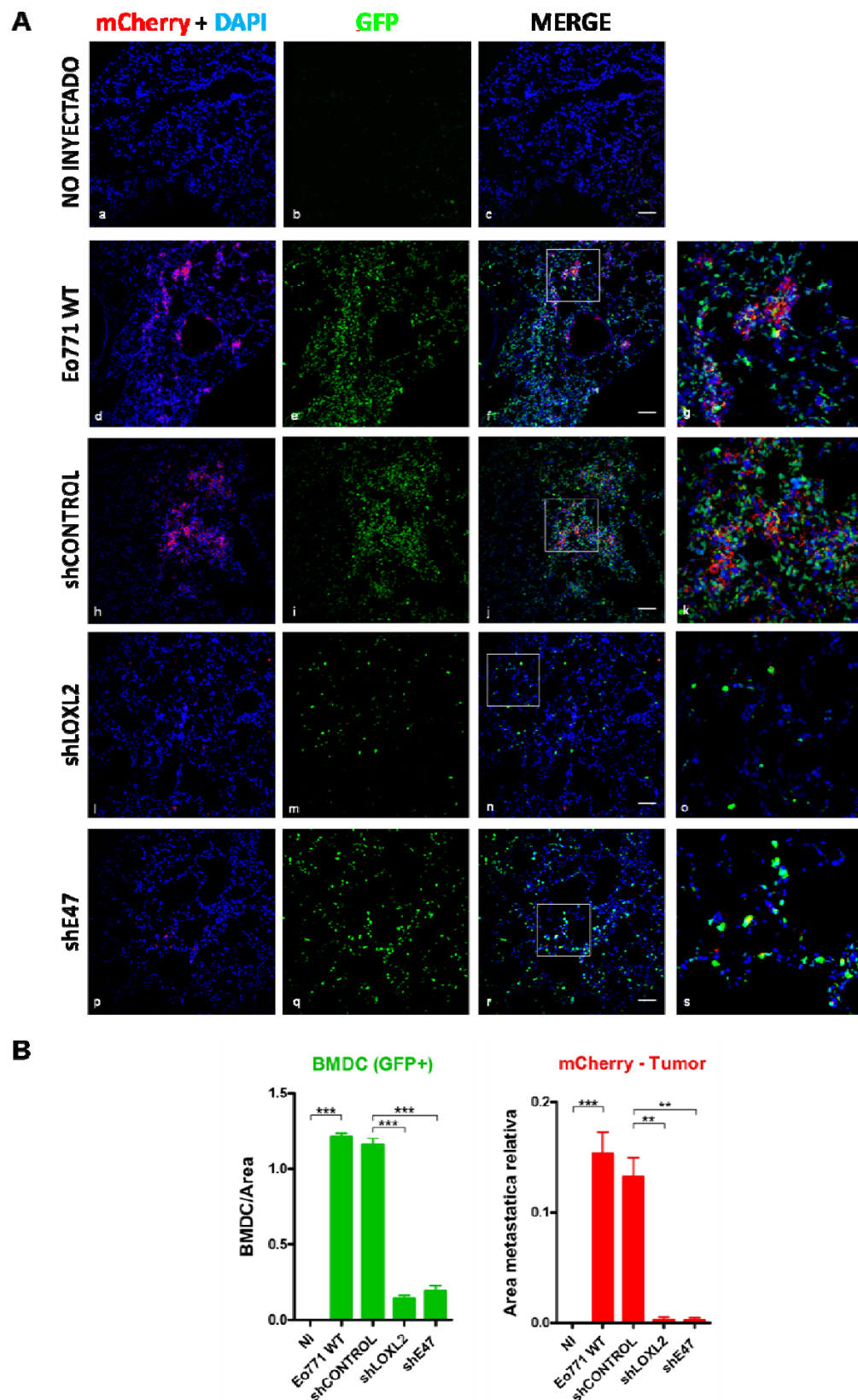


FIGURA 34: Análisis de las micrometástasis y del reclutamiento de células derivadas de la médula ósea (BMDCs) GFP⁺ en pulmones. **A)** Las ratonas C57/Bl6 fueron irradiadas y trasplantadas con médula ósea derivada de ratones GFP⁺, y tras la reconstitución de la médula fueron inyectados en MFP con células Eo771 WT y los clones interferidos (shControl, shLOXL2 y shE47). A día 15 post-inyección los ratones se sacrificaron y los pulmones se analizaron por inmunofluorescencia para la detección de micrometástasis (células mCherry⁺, paneles a,d,h,l,p) o de BMDCs (GFP⁺, paneles b,e,i,m,q). Los núcleos se marcaron con DAPI. Las imágenes de superposición (paneles c,f,j,n,r) muestran el reclutamiento de BMDCs a las áreas metastásicas. Las imágenes ampliadas (paneles g,k,o,s,) muestran detalles de metástasis mCherry⁺ y BMDCs GFP⁺. Barra: 100 μ m. **B)** Análisis cuantitativo de la infiltración de BMDCs (GFP⁺) por área analizada y del área metastásica (mCherry⁺) en los pulmones de los grupos analizados. Obsérvese la gran disminución de BMDCs y la práctica ausencia de células metastásicas en los pulmones de ratones inyectados con clones shLOXL2 y shE47. Barra, desviación estándar; **p<0.01, ***p<0.001 por test ANOVA.

3.3.3. Estudio de expresión de factores implicados en la formación del nicho metastásico

Diversos estudios han puesto de manifiesto la participación activa de fibronectina y de LOX prototípica en la remodelación de la matriz extracelular del nicho premetastásico (Kaplan et al., 2005; Psalia and Lyden, 2009; Erler et al., 2009). Hipótesis recientes avalan asimismo la participación de varios factores de crecimiento, citoquinas y otras moléculas de matriz extracelular secretadas por el tumor primario para el reclutamiento de BMDC y la generación del nicho (Kaplan et al., 2006; Hiratsuka et al., 2006; Ye et al., 2010). Por esto, decidimos a continuación estudiar la implicación de E47 y LOXL2 en la expresión de varios de estos factores.

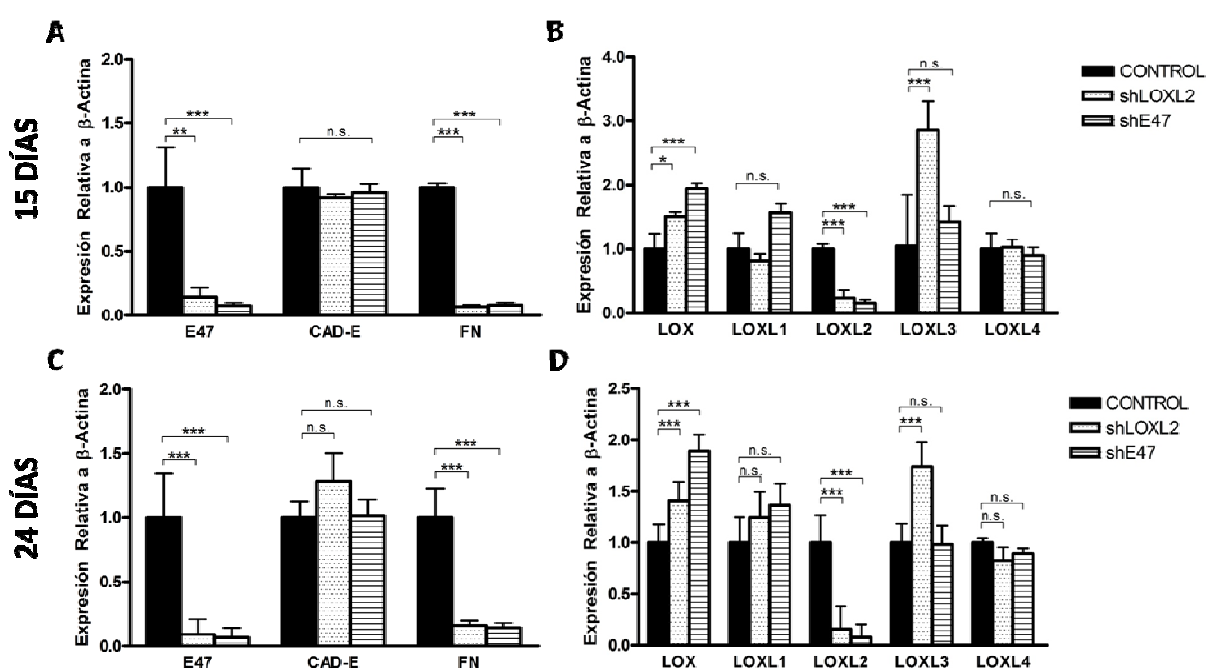


FIGURA 35: Análisis de PCR cuantitativa en los tumores primarios a 15 y a 24 días después de la inyección en mama de células Eo771 shCONTROL y de los clones interferidos (shLOXL2 #3 y shE47pool). Se analizaron los niveles de expresión del RNA mensajero de factores implicados en la TEM (E47, cadherina-E = CAD-E, fibronectina = FN), y de distintos miembros de la familia de las Lisil Oxidasas (LOX y LOXL1-4) a 15 días p.i. (**A y B**) y a 24 días p.i. (**C y D**). Los resultados muestran la media de 3 experimentos independientes. Barras, desviación estándar; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s.= no significativo por test ANOVA.

3.3.3.1. Implicación de E47 y LOXL2 en la expresión de fibronectina y miembros de la familia LOX en el nicho pre-metastásico.

Para comprobar un papel de LOXL2 y E47 en la formación de nicho metastásico, decidimos analizar inicialmente la expresión de algunos marcadores, fibronectina y miembros de la familia LOX, que han sido relacionados con la formación y la regulación del nicho premetastásico.

Los análisis por PCR cuantitativa de los niveles de expresión de LOXL2 y E47 en los tumores primarios confirmaron, en primer lugar, que los niveles de ambos factores se mantienen bajos como consecuencia del silenciamiento a 15 y a 24 días p.i. (Figura 35). Significativamente, también se detectaron bajos niveles de mRNA de E47 y de LOXL2 en los tumores inducidos por células interferidas para LOXL2 y E47, respectivamente, a ambos tiempos de inyección (Figura 35), sugiriendo mecanismos de regulación cruzada entre ambos factores en el contexto tumoral. El silenciamiento de E47 y LOXL2 no tuvo efecto alguno sobre la expresión del mRNA de cadherina-E en los tumores primarios inducidos por las células Eo771 (Figura 35A, C), de forma similar a lo observado en los cultivos celulares (Figura 23).

Por el contrario, el silenciamiento de E47 y LOXL2 afecta significativamente a la expresión del mRNA de fibronectina en los tumores primarios, cuyos niveles bajan drásticamente a 15 y a 24 días post-inyección (Figura 35A, C), confirmando así los resultados del mismo análisis realizados en las líneas celulares Eo771shControl, Eo771shLOXL2 y Eo771shE47 (Figura 23). De la misma manera, el análisis de expresión de los miembros de la familia LOX demostró que en los tumores primarios analizados a 15 y a 24 días post-inyección la interferencia de LOXL2 induce la expresión del mRNA de LOX y de LOXL3, mientras que el silenciamiento de E47 solo afecta a los niveles de mRNA de LOX (Figura 35B, D), confirmando también los resultados obtenidos en las líneas en cultivo (Figura 27).

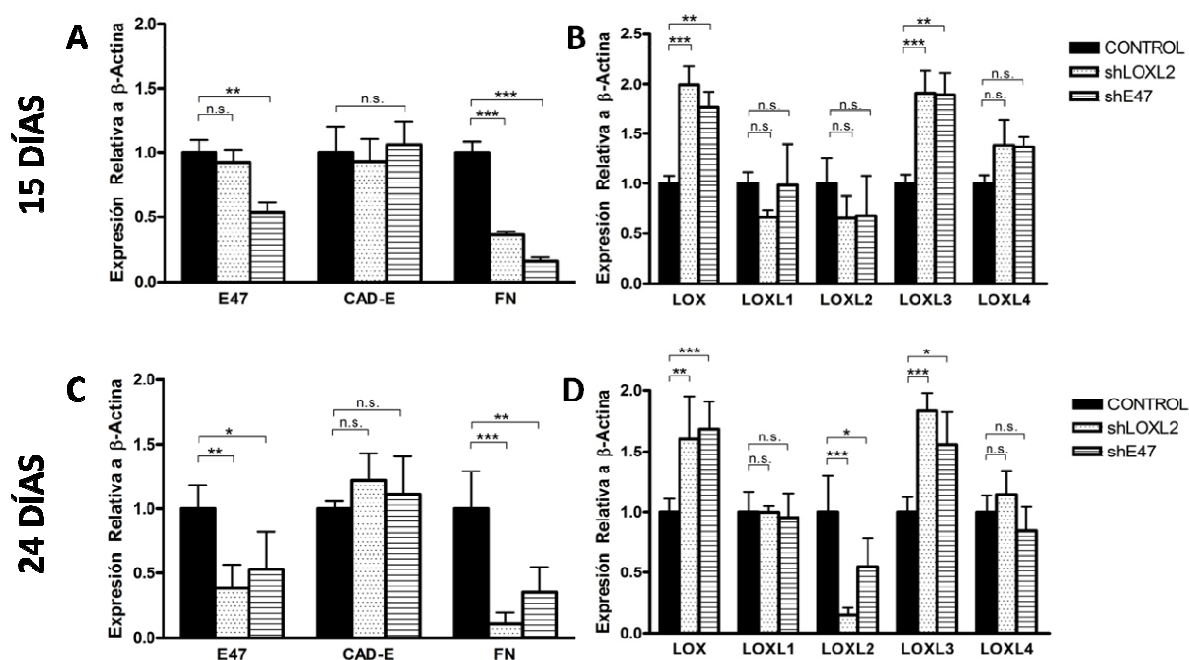


FIGURA 36: Análisis de PCR cuantitativa en los pulmones a 15 y a 24 días después de la inyección en mama de células Eo771 shControl y de los clones interferidos (shLOXL2 y shE47). Se analizaron los niveles de expresión del RNA mensajero de factores implicados en la TEM (E47, cadherina-E = CAD-E, fibronectina = FN), y de distintos miembros de la familia de las Lisil Oxidasas (LOX y LOXL1-4) en los pulmones a 15 días p.i. (**A y B**) y a 24 días p.i. (**C y D**). Los resultados muestran la media de 3 experimentos independientes. Barras, desviación estándar; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s.= no significativo por test ANOVA.

Los mismos análisis de expresión se realizaron adicionalmente en los pulmones de los ratones inyectados con células Eo771shControl, Eo771shLOXL2 y Eo771shE47, a 15 y 24 días post-inyección (Figura 36). Los resultados obtenidos mostraron que en los pulmones a 15 días post-inyección no se detectan disminuciones significativas en la expresión del mRNA de LOXL2 en ninguno de los grupos experimentales respecto al control (Figura 36B, paneles LOXL2), lo que probablemente refleja la expresión de LOXL2 en el tejido pulmonar. Por otro lado, los niveles de expresión del mRNA de E47 se mantuvieron disminuidos en los pulmones de los ratones shE47 (Figura 36A, paneles E47), mientras no se vieron diferencias significativas en los pulmones de los ratones shLOXL2 respecto al control (Figura 36A, paneles E47).

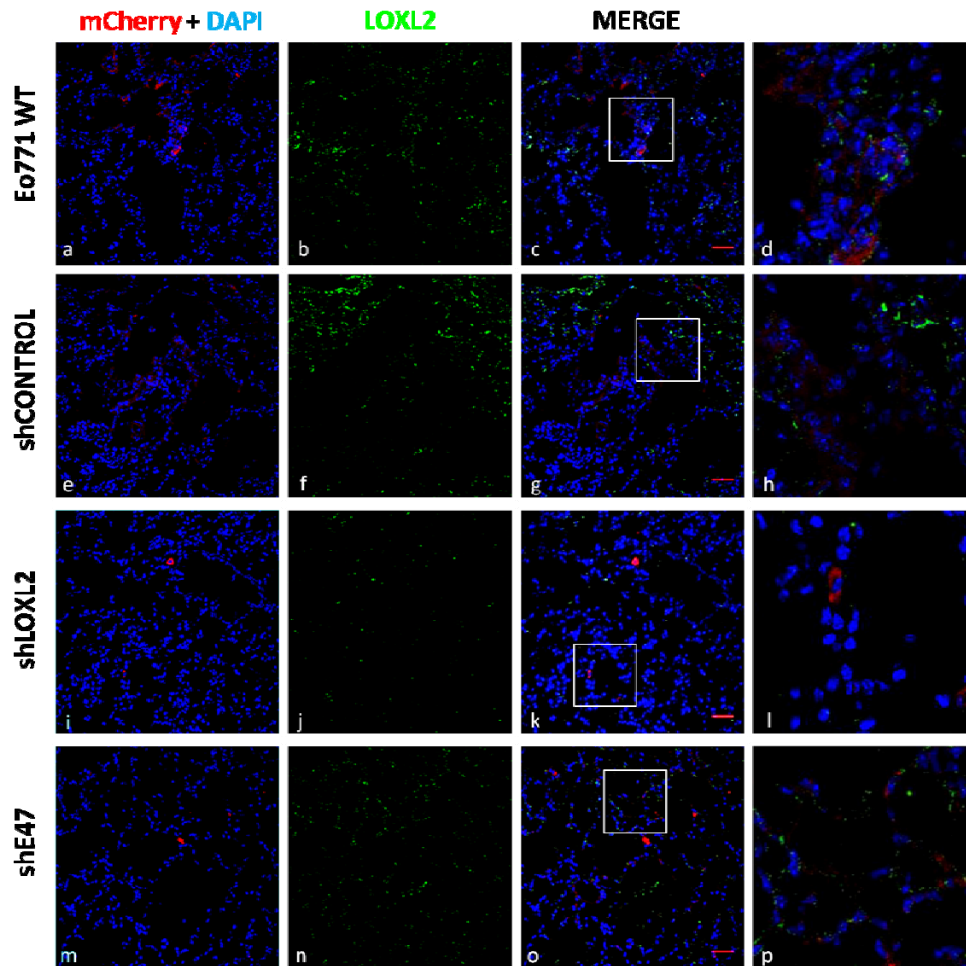


FIGURA 37: Análisis de las micrometástasis y de la expresión de LOXL2 en pulmones de ratones C57Bl/6. Las ratonas C57Bl/6 fueron inyectadas en MFP con células Eo771 WT y los clones interferidos indicados (shControl, shLOXL2#3 y shE47pool). A día 15 post-inyección las ratonas se sacrificaron y los pulmones se analizaron por inmunofluorescencia para la detección de micrometástasis (mCherry⁺, paneles a, e, i, m) y de LOXL2 (paneles b, f, j, n). Los núcleos se marcaron con DAPI. Las imágenes de superposición (merge) (paneles c, g, k, o) y las imágenes ampliadas (paneles d, h, l, p,) muestran detalles de micrometástasis mCherry⁺ detectadas por la presencia de células y la tinción específica de LOXL2. Barra: 100 μm.

Los análisis de los pulmones a 24 días post-inyección mostraron que los niveles de mRNA de ambos factores disminuyen significativamente en los ratones inyectados con células shLOXL2 y shE47 con respecto a los ratones inyectados con células shControl (Figura 36C, panel E47; Figura 36D, panel LOXL2), manteniéndose la aparente regulación cruzada entre E47 y LOXL2 observada en los tumores primarios. Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de la llegada de las células tumorales al pulmón y la formación de micrometástasis pulmonares en estadios más tardíos (Psalia and Lyden, 2009). Adicionalmente, los análisis de inmunofluorescencia a 15 días p.i. mostraron una leve disminución de la expresión de LOXL2 en los pulmones de los ratones inyectados con células shLOXL2 y shE47, comparado con los ratones inyectados con células Eo771WT o shControl (Figura 37b, f, j, n). Este resultado parece no concordar con los datos de PCR cuantitativa (Figura 36B, panel LOXL2), si bien se puede explicar por las diferencias experimentales entre ambas aproximaciones. Por otra parte, los análisis de PCR cuantitativa mostraron una notable disminución de los niveles de fibronectina ya a partir de los 15 días post-inyección, tanto en los pulmones de los ratones inyectados con células shLOXL2 como con células shE47 (Figura 36A, C), mientras que los niveles de mRNA de cadherina-E en los pulmones no se vieron afectados en ningún caso (figuras 36A, C).

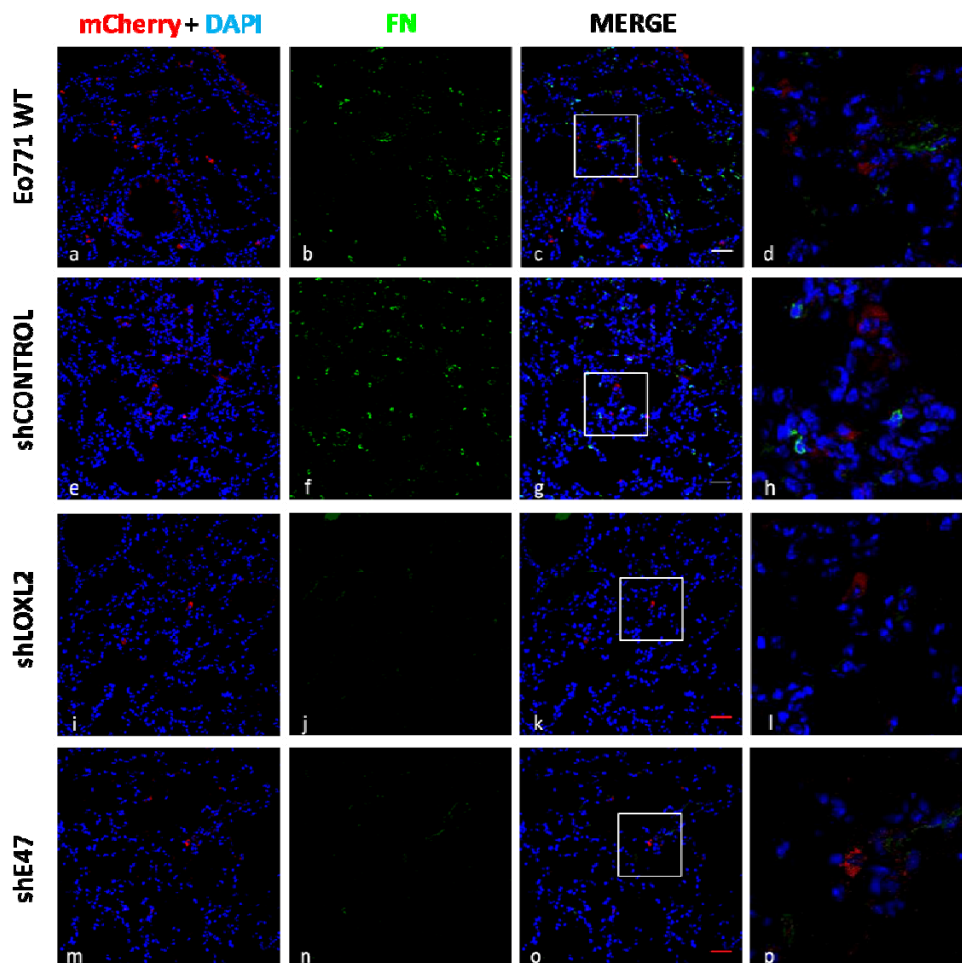


FIGURA 38: Análisis de las micrometástasis y de la expresión de fibronectina (FN) en pulmones de ratones C57Bl/6. Las ratonas C57Bl/6 fueron inyectadas en MFP con células Eo771 WT y los clones interferidos indicados (shControl, shLOXL2#3 y shE47pool). A día 15 post-inyección las ratonas se sacrificaron y los pulmones se analizaron por inmunofluorescencia para la detección de micrometástasis (células mCherry⁺, paneles a, e, i, m) y de FN (paneles b, f, j, n). Los núcleos se marcaron con DAPI. Las imágenes de superposición (merge) (paneles c, g, k, o) y las imágenes ampliadas (paneles d, h, l, p,) muestran detalles de micrometástasis mCherry⁺ detectadas por la presencia de células y la tinción específica de FN. Barra: 100 μ m.

Además, los análisis de inmunofluorescencia confirmaron la disminución de los niveles de fibronectina en los pulmones de ratones inyectados con células shE47 y shLOXL2 respecto a los controles a 15 días p.i. (Figura 38b, f, j, n). El silenciamiento de LOXL2 y de E47 tuvo como consecuencia una inducción de la expresión del mRNA de LOX y de LOXL3 en los pulmones a 15 y 24 días post-inyección, mientras que los niveles de los otros miembros de la familia LOX no se vieron afectados (Figura 36B, D), de forma similar a lo observado en los tumores primarios (ver Figura 35B, D). Además, la inducción de la expresión de LOX se confirmó mediante análisis de inmunofluorescencia en los pulmones a 15 días post-inyección (Figura 39).

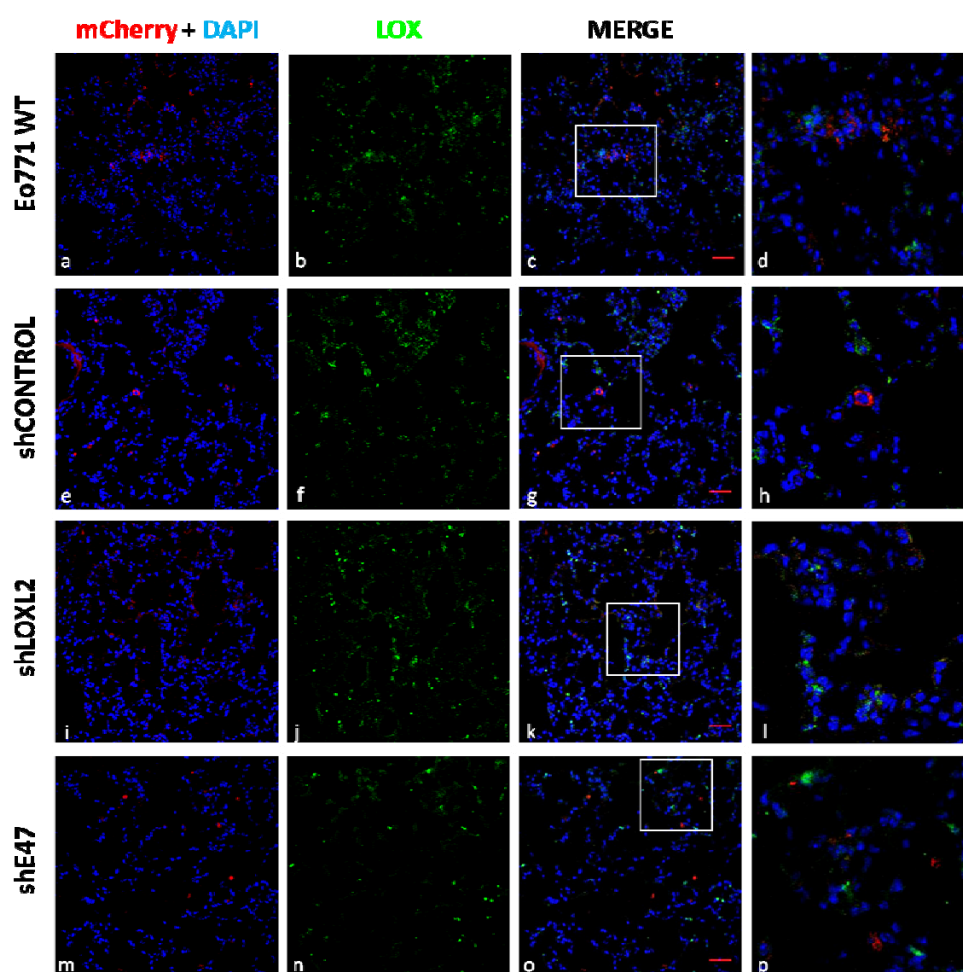


FIGURA 39: Análisis de las micrometástasis y de la expresión de LOX en pulmones de ratones C57/B6. Las ratonas C57/B6 fueron inyectadas en MFP con células Eo771 WT y los clones interferidos indicados (shControl, shLOXL2#3 y shE47pool). A día 15 post-inyección las ratonas se sacrificaron y los pulmones se analizaron por inmunofluorescencia para la detección de micrometástasis (células mCherry⁺, paneles a, e, i, m) y de LOX (paneles b, f, j, n). Los núcleos se marcaron con DAPI. Las imágenes de superposición (merge) (paneles c, g, k, o) y las imágenes ampliadas (paneles d, h, l, p,) muestran detalles de las micrometástasis detectadas por la presencia de células mCherry⁺ y la tinción específica de LOX. Barra: 100 μ m.

3.3.3.2. Implicación de E47 y LOXL2 en la expresión de factores de crecimiento y citoquinas implicadas en el nicho pre-metastásico

Debido a las nuevas hipótesis que apoyan un papel para los factores secretados por el tumor en la formación del nicho metastático, decidimos estudiar si el silenciamiento de E47 y LOXL2 afecta la transcripción y la expresión de algunos genes implicados en su regulación (Hiratsuka et al., 2006; Oskarsson et al., 2011). Para ello, analizamos en primer lugar mediante PCR cuantitativa los niveles de expresión del Factor de estimulación de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), del Factor de crecimiento transformante β (TGF β), del Factor de necrosis tumoral α (TNF α), de Tenascina-c (TEN-C) y de Angiopoietina-1 (ANG-1) en las células Eo771 control y tras la interferencia de E47 y LOXL2. Como se muestra en la Figura 40, el silenciamiento de E47 y de LOXL2 induce una marcada disminución de la expresión de mRNA de GM-CSF (mucho más acusada tras el silenciamiento de E47), TNF α y ANG-1 en las líneas celulares en cultivo, mientras que no se observaron cambios significativos en los niveles de TGF β y TEN-C. Los análisis de PCR cuantitativa de los niveles de expresión de factores secretados por el tumor primario e implicados en la formación del nicho metastático, confirmaron los resultados obtenidos en las líneas celulares, mostrando que el silenciamiento de E47 y de LOXL2 induce una elevada disminución de la expresión de mRNA de GM-CSF, TNF α y ANG-1, mientras no se observan cambios significativos en los niveles de TGF β y TEN-C, a los 15 y a 24 días post-inyección (Figura 41).

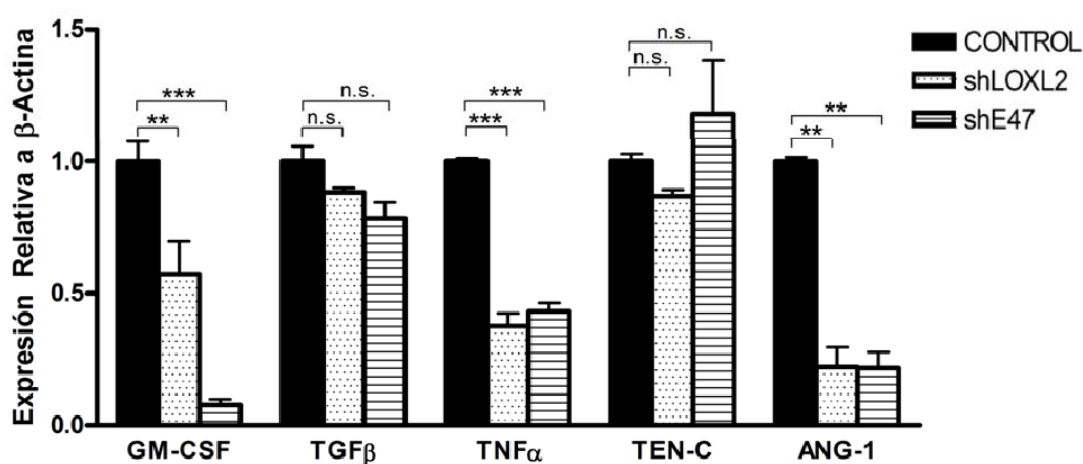


FIGURA 40: Análisis de los niveles de expresión de citoquinas implicadas en la regulación del nicho premetastático en las líneas celulares. Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de expresión del RNA mensajero de citoquinas y quimioquinas en las líneas celulares en cultivo indicadas. GM-CSF= factor de estimulación de colonias de granulocitos y monocitos; TGF β = factor de transformación del crecimiento β ; TNF α = factor de necrosis tumoral α ; TEN-C= tenascina-C; ANG-1= angiopoietina-1. Los resultados muestran la media de 3 experimentos independientes. Barras, desviación estándar; **p<0.01, ***p<0.001, n.s.= no significativo por test ANOVA.

Finalmente, se analizó la expresión de citoquinas y quimioquinas en los pulmones de los animales inyectados en glándula mamaria con células control o interferidas para E47 y LOXL2 (Figura 42). Los resultados obtenidos también mostraron que los niveles de mRNA de GM-CSF, TNF α y ANG-1 se encontraban fuertemente disminuidos tras el silenciamiento de E47 y LOXL2, mientras que no se observaron cambios significativos respecto a los controles en los niveles de mRNA de TGF β y TEN-C en los pulmones extraídos a 15 y a 24 días post-inyección (Figura 42A, C). Trabajos recientes de varios grupos han demostrado un papel importante para las quimioquinas S100A8 y S100A9 en el reclutamiento de células de la médula ósea a los órganos secundarios para la generación del nicho pre-metastásico (Hiratsuka et al., 2006; Rafii and Lyden, 2006). La expresión de estas quimioquinas aumenta en los sitios metastásicos bajo la inducción de factores secretados por el tumor primario, y a su vez favorece el reclutamiento de células de la médula ósea previo a la llegada de las metástasis (Hiratsuka et al., 2006; Rafii and Lyden, 2006). Nuestros análisis destacaron que en el modelo de las células Eo771 la expresión de las citoquinas S100A8 y S100A9 se reprime como consecuencia de la

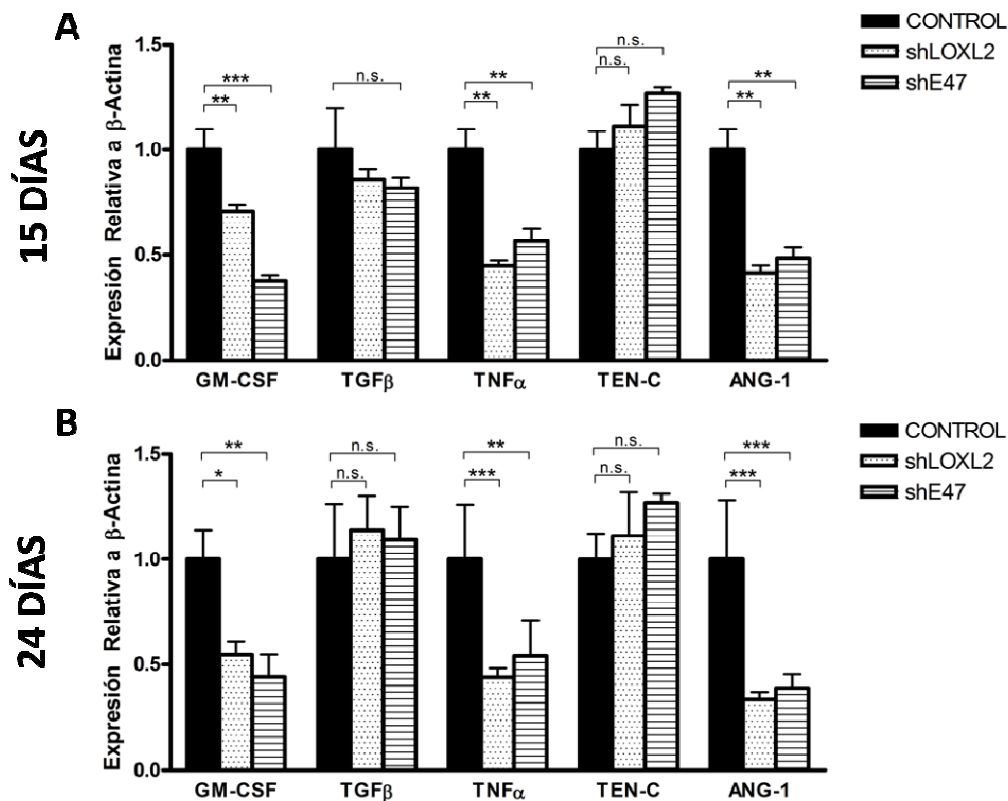


FIGURA 41: Análisis de los niveles de expresión de citoquinas implicadas en la regulación del nicho premetastásico en tumores primarios a 15 y a 24 días después de la inyección en glándula mamaria. Se analizaron los niveles de expresión del RNA mensajero de citoquinas y en los tumores primarios obtenidos tras la inyección de las líneas indicadas a 15 días p.i. (A) y a 24 días p.i. (B). GM-CSF= factor de estimulación de colonias de granulocitos y monocitos; TGF β = factor de transformación del crecimiento β ; TNF α = factor de necrosis tumoral α ; TEN-C= tenascina-C; ANG-1= angiopoietina-1. Los resultados muestran la media de 3 experimentos independientes. Barras, desviación estándar; * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, n.s.= no significativo por test ANOVA.

interferencia de LOXL2 y E47 (Figura 42B, D). En los pulmones extraídos a 15 y 24 días post-inyección de los ratones inyectados con las células shLOXL2 y shE47 se detectan niveles extremadamente bajos de mRNA de S100A8 y S100A9 comparado con los ratones inyectados con las células shControl. Estos resultados indican que las proteínas LOXL2 y E47 podrían estar implicadas en la regulación de dichas quimioquinas para la formación del nicho pre-metastásico.

En conjunto, estos datos apoyan un papel de LOXL2 y E47 en el reclutamiento de células precursoras de la médula ósea al pulmón y en la regulación de algunos factores implicados en la formación del nicho pre-metastásico, como varias quimioquinas y fibronectina.

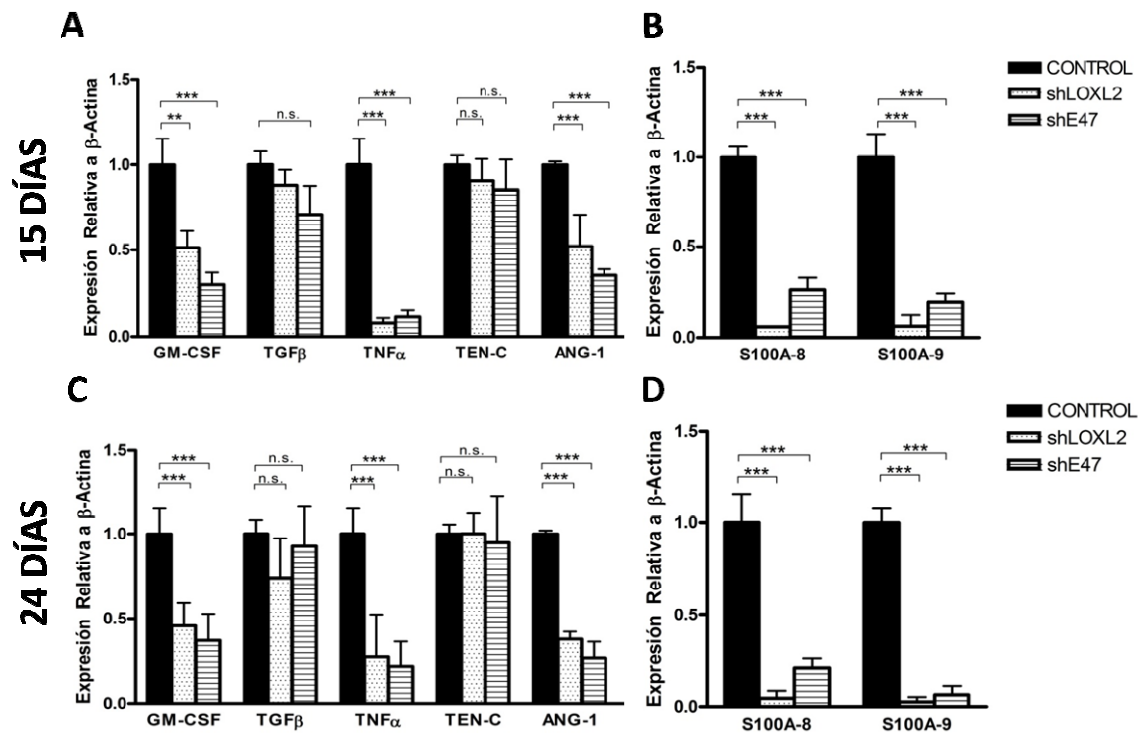


FIGURA 42: Análisis de los niveles de expresión de citoquinas implicadas en la regulación del nicho premetastático en pulmones a 15 y a 24 días después de la inyección en glándula mamaria. Se analizaron los niveles de expresión del RNA mensajero de citoquinas y quimioquinas en pulmones extraídos a 15 días p.i. (**A y B**) y a 24 días p.i. de las líneas celulares indicadas (**C y D**). GM-CSF= factor de estimulación de colonias de granulocitos y monocitos; TGFβ= factor de transformación del crecimiento β; TNFα= factor de necrosis tumoral α; TEN-C= tenascina-C; ANG-1= angiopoietina-1. Los resultados muestran la media de 3 experimentos independientes. Barras, desviación estándar; **p<0.01, ***p<0.001, n.s.= no significativo por test ANOVA.

DISCUSIÓN

1. Función del gen *E2A* en la carcinogénesis química de piel de ratón

Durante la última década el proceso de TEM ha cobrado una enorme relevancia en la progresión tumoral, considerándose actualmente un evento clave de la invasión tumoral y otras etapas de la metástasis (Polyak and Weinberg, 2009; revisado en Thiery et al., 2009). Uno de los eventos clave de la TEM es la represión de *cadherina-E*; la identificación inicial de Snail1 como un represor transcripcional de *cadherina-E* e inductor de TEM supuso un hito importante en este campo (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000). Estudios posteriores de nuestro laboratorio y de otros grupos identificaron otros represores de *cadherina-E* e inductores de TEM, de las familias Snail, bHLH y Zeb (revisado en Peinado et al, 2007), así como otros factores de TEM que actúan como represores indirectos de *cadherina-E* (revisado en Thiery et al., 2009; revisado en Nieto, 2011). Entre los represores de *cadherina-E* inicialmente identificados se encuentra el factor bHLH E47 (Pérez-Moreno et al., 2001), en el que se ha centrado el proyecto de esta tesis.

En trabajos anteriores de nuestro grupo, los análisis de expresión de E47 en líneas celulares tumorales mostraron una mayor expresión en las líneas más invasivas y tumorogénicas de carcinomas y melanomas, las mismas líneas que presentan un bajo nivel de expresión de *cadherina-E* y un fenotipo típicamente mesenquimático (Pérez-Moreno et al, 2001). Además, estudios adicionales de nuestro grupo indican que E47 está sobre-expresado en carcinomas de mama de fenotipo basal, un subtipo muy agresivo y de mal pronóstico (Cubillo, 2007; Cubillo et al., en preparación). A pesar de estos datos que relacionan a E47 con la malignidad y la agresividad de los tumores, no existen hasta la fecha datos *in vivo* que impliquen a este factor con la progresión tumoral en tumores sólidos; de hecho, no se conocen modelos murinos de carcinomas que hayan sido utilizados para estudios de este tipo.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, decidimos, en primer lugar, estudiar el papel de E47 en la carcinogénesis química de piel de ratón. Para ello, realizamos ensayos de carcinogénesis inducida por DMBA/TPA en ratones mutantes *knock-out* condicionales para el gen *E2A* (que codifica para las dos isoformas E12/E47). Ensayos iniciales mostraron que la introducción de uno o los dos alelos *E2A*^{flox} no tiene un efecto significativo en la incidencia o número de lesiones generadas comparado con los ratones que portan los dos alelos *E2A*^{wt} (Figura 12). La mayoría de las lesiones generadas en este estudio correspondían a papilomas bien diferenciados (datos no mostrados). La eliminación del gen *E2A* tras el tratamiento con DMBA/TPA (a las 20 semanas tras la iniciación) no evidenció diferencias significativas entre los 3 genotipos de ratones (*E2A*^{Wt/Wt}, *E2A*^{Wt/Flox} y *E2A*^{Flox/Flox}) analizados en cuanto a la incidencia, latencia, tamaño o tipo de las lesiones generadas, produciéndose prevalentemente papilomas bien diferenciados en todos los grupos (Figuras 13 y 15A). Este resultado parece sugerir que la

expresión de las proteínas E2A no tiene efecto sobre la progresión de dichas lesiones. Curiosamente, los ratones $E2A^{Flox/Wt}$ desarrollaron un número ligeramente inferior de lesiones comparado con los ratones $E2A^{Wt/Wt}$ y $E2A^{Flox/Flox}$, aunque en este caso el número tan exiguo de ratones analizados de cada grupo no permite sacar conclusiones sobre el efecto de la delección de un solo alelo del gen *E2A* (Figura 13). Sin embargo, cuando se indujo la delección del gen *E2A* tras la iniciación con DMBA y antes del tratamiento con TPA, los ratones $E2A^{-/-}$ y $E2A^{+/-}$ desarrollaron un número significativamente inferior de lesiones comparado con los ratones $E2A^{+/+}$ (Figura 14) indicando que la delección de un alelo de *E2A* desde el inicio es suficiente para reducir la aparición de lesiones. Sorprendentemente, en los ratones $E2A^{-/-}$ se generaron solo lesiones malignas avanzadas (SCC) y el porcentaje de estas lesiones en los ratones $E2A^{+/-}$ (44%) fue mayor que las generadas en los ratones $E2A^{+/+}$ (20%) (Figura 15B), así como en los ratones de cualquier genotipo tratados con vehículo o no sometidos a tratamiento, que desarrollaron mayoritariamente papilomas (Figura 15 y datos no mostrados). Estos resultados parecen indicar que la ausencia de las proteínas E2A desde el inicio de la carcinogénesis favorece la progresión tumoral, si bien el bajo número de tumores generados en los ratones $E2A^{-/-}$ hace introducir una nota de precaución. En principio, esta observación es sorprendente, considerando el papel de E47 como represor de *cadherina-E* e inductor de TEM y la correlación entre la expresión de E47 y la malignidad de algunas líneas tumorales y carcinomas (Pérez-Moreno et al., 2001; Cubillo, 2007; Peinado et al., 2007). Un comportamiento similar se ha observado recientemente en nuestro grupo para *Snail2*, un gen que también ha sido descrito como represor de *cadherina-E* e inductor de TEM (Hajra et al., 2002; Bolós et al., 2003). La ausencia constitutiva de *Snail2* favorece la aparición de lesiones y su malignización durante el proceso de carcinogénesis química inducida por DMBA/TPA, aparentemente debido a un aumento de la capacidad proliferativa de las células tumorales y a alteraciones en el programa de diferenciación terminal de los queratinocitos (Molina-Ortiz P., 2010). En el caso de *E2A* no hemos analizado si la eliminación del gen induce cambios en la tasa de proliferación y/o de apoptosis de los queratinocitos primarios, lo que podría explicar el efecto sobre la formación de tumores. El posible papel como supresor tumoral de las proteínas E2A en la carcinogénesis de piel de ratón está, por otra parte, de acuerdo con el papel supresor previamente descrito en tumores hematopoyéticos. Así, los ratones $E2A^{-/-}$ desarrollan espontáneamente linfomas de células T entre los 3 y los 10 meses de edad, de la misma manera que los ratones deficientes en la isoforma E47 (Bain et al., 1997; Yan et al., 1997). Además, un papel de supresión tumoral para las proteínas E2A ha sido demostrado recientemente en linfomas humanos, donde se ha mostrado que la pérdida genómica del locus 19p13.3, que incluye el gen *E2A* humano, induce el desarrollo del síndrome de Sézary

(Steininger et al., 2011), una variante muy agresiva de linfomas cutáneos de células T, que se caracteriza por la presencia de células T neoplásicas en la piel, en los nódulos linfáticos y en la sangre periférica (Burg et al., 2005). En este caso, las proteínas E2A regulan negativamente una serie de genes implicados en la tumorigénesis, como *MYC* o *CDK6*, por lo que su ausencia contribuye al desarrollo de la enfermedad (Steininger et al., 2011).

En conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo parecen indicar que el gen *E2A* tiene un papel dual en la carcinogénesis química de piel de ratón, actuando como promotor tumoral en etapas tempranas y como supresor tumoral durante la progresión, ya que su presencia favorece la aparición de lesiones al mismo tiempo que impide el desarrollo de lesiones malignas. Merece la pena mencionar que un comportamiento dual similar en la carcinogénesis de piel de ratón se ha descrito para otros genes relevantes, como p53 o TGF β (Kemp et al., 1993; Cui et al., 1994; revisado en Akhurst and Balmain, 1999). Uno de los primeros eventos de la iniciación química mediada por el carcinógeno DMBA es la activación del oncogén H-ras mediante la mutación específica del codón 61 (Balmain et al., 1984; Brown et al., 1986; Quintanilla et al., 1986). Se ha descrito que la actividad de E47 depende de la activación de Ras, y que la vía de Ras también regula los factores Id, que se han identificado como inhibidores de las proteínas E2A (Ordentlich et al., 1998; Bain et al., 2001). Vale la pena recordar que en uno de nuestros abordajes, la escisión de *E2A* se indujo justo después de haber inducido la iniciación química con DMBA, y antes del tratamiento con TPA: por lo tanto, cabe la posibilidad de que la activación del oncogén H-Ras regule directa o indirectamente la actividad de las proteínas E2A para favorecer la tumorigénesis en la etapa más temprana del proceso, lo que no ocurriría en ausencia del gen *E2A*. En este sentido, las proteínas E2A podrían no solo contribuir, si no ser necesarias para la iniciación del proceso de tumorigénesis, aunque estudios adicionales en presencia y ausencia de H-Ras, y estudios de delección de *E2A* antes de la iniciación química ayudarían a elucidar este punto. Por otra parte, la utilización de ratones deficientes en E47 permitiría discriminar entre las dos isoformas de E2A (E47 y E12).

Una hipótesis interesante que merecería la pena investigar en estudios posteriores es la implicación de células madre de la epidermis en la inducción de las lesiones tumorales. Muchos estudios han puesto de manifiesto que el desarrollo de carcinomas de piel y su progresión depende estrictamente de células iniciadoras específicas y del microambiente o nicho en el que se encuentran estas células (revisado en Boehnke et al., 2012). Actualmente se considera que las células madre de la epidermis se localizan en una región específica del folículo piloso, denominada “bulge” (Blanpain and Fuchs, 2006). A partir de esta zona, las células madre se movilizan en respuesta a diferentes señales, dando lugar a los progenitores

que se localizan en la capa basal de la epidermis, que mantienen capacidad proliferativa restringida, y dan lugar a otros linajes de la epidermis (Ohyama M, 2006; Watt et al., 2006; Blanpain and Fuchs, 2009; revisado en Fuchs E, 2009). Las células madre del “bulge”, a pesar de ser relativamente quiescentes, se dividen con cada ciclo del pelo para mantener su homeostasis (Jaks et al., 2008), y se activan también en respuesta a varios tipos de lesiones que estimulan su movilización y su programa de diferenciación (Ito et al., 2005; Levy et al., 2007). Todo este proceso está estrictamente regulado, y se conoce que entre las rutas de señalización implicadas, la de Wnt/ β -catenina y la de Notch juegan un papel fundamental (revisado en Boehnke et al., 2012). Ambas rutas participan en la regulación de la proliferación y de la diferenciación de las células madre: por ejemplo, la vía de Wnt/ β -catenina es esencial para el mantenimiento y movilización de las células madre del “bulge” (Malanchi et al., 2008) mientras que la vía de señalización de Notch actúa promoviendo la diferenciación terminal de la epidermis, por lo que se considera este gen como un supresor tumoral (Nicolas et al., 2003). Además, se ha descrito que la inhibición de la ruta de Notch en la epidermis induce la formación de carcinomas escamosos espontáneos (Proweller et al., 2006; Watt et al., 2008). Varios trabajos han mostrado una relación entre las proteínas E2A y la vía de señalización de Notch: en muchos casos se ha documentado la inhibición de la expresión de las proteínas E2A mediante la ruta de señalización de Notch (Nie et al., 2003; Huang et al., 2004; Talora C, 2005). Sin embargo, en otros modelos E47 también ha sido implicado en la inducción de la vía de Notch: así, se ha propuesto que E47 induce la expresión de un grupo de genes implicados en la ruta de Notch y que actúa en paralelo con Notch para la promoción de la maduración de linfocitos T, indicando que podría existir una colaboración entre estas proteínas (Ikawa et al., 2006). Aunque en el presente trabajo no hemos estudiado la relación entre E2A y la vía de Notch, se puede especular que la delección del gen *E2A* en la epidermis podría estar afectando a la vía de señalización de Notch, de tal manera que el proceso de diferenciación de las células madre del “bulge” no estaría tan estrictamente controlado como en condiciones normales, lo que podría favorecer la aparición o progresión de las lesiones tumorales. En relación con la vía de Wnt/ β -catenina y proteínas E2A existen muy pocos datos en la literatura, con excepción de la relación entre la proteína de fusión E2A-PBX1 y la vía de Wnt no canónica en leucemias linfoblásticas agudas (Mazieres et al., 2005; revisado en Nygren et al., 2009), por lo que no se puede descartar la existencia de algún tipo de regulación en la epidermis de las proteínas E2A por la vía de Wnt.

2. Interacción y cooperación funcional entre E47 y LOXL2

Los estudios realizados hasta la fecha en diferentes líneas celulares de origen epitelial, indican que la expresión estable del factor bHLH E47 favorece la represión de la expresión de cadherina-E e induce una TEM completa (Pérez-Moreno et al, 2001; Kondo et al, 2004; Peinado et al, 2004b). Además, se ha demostrado que la represión de *cadherina-E* mediada por E47 es dependiente del dominio E-pal de cadherina-E (Pérez-Moreno et al, 2001; Bolós et al., 2003; Cubillo et al., en preparación). Sin embargo, no se conoce el mecanismo específico por el que E47 ejerce su acción represora sobre el promotor de *cadherina-E*. En general, la represión transcripcional mediada por los factores bHLH requiere la heterodimerización con otros factores de la misma familia, como en el caso de Mist1 y MyoD, o de Twist y Daughterless (Lemerrier et al, 1998; Castanon et al, 2001). Para E47 solo se ha descrito la formación de los heterodímeros E47/MyoD para la activación de genes miogénicos (Berkes and Tapscott, 2005). Sin embargo, no se descarta que también para su actividad represora se requiera la interacción de E47 con otros factores que puedan actuar como co-represores y que puedan regular su función. Con el fin de identificar posibles factores reguladores de E47, en nuestro laboratorio se llevó a cabo un experimento de doble híbrido, identificando varios candidatos potenciales entre los que se encontraba LOXL2 (datos no mostrados), por lo que nos propusimos caracterizar funcionalmente su interacción con E47.

LOXL2 pertenece a la familia lisil oxidasas, caracterizadas inicialmente como enzimas extracelulares responsables de la biogénesis del tejido conectivo debido a la catálisis de reacciones de desaminación oxidativa de residuos de lisina y la subsiguiente formación de enlaces covalentes de proteínas de la matriz extracelular, como colágenos y elastina (Csiszar, 2001). Sin embargo, la presencia de estas moléculas a nivel intracelular ha sido documentada ampliamente, lo que pone en evidencia otras posibles funciones para los miembros de la familia LOX (Szauter et al, 2005; Lucero and Kagan, 2006; Payne et al, 2007; Cano et al., 2012). En nuestro estudio sobre la posible interacción entre LOXL2 y E47, los análisis de inmunofluorescencia mostraron que a pesar de que E47 se localice prevalentemente en el núcleo y LOXL2 en el citoplasma, las dos proteínas pueden colocalizar en la zona perinuclear (Figura 17), donde podrían estar interaccionando a nivel funcional. La interacción entre E47 y LOXL2 se confirmó a nivel bioquímico en los análisis de co-inmunoprecipitación y de “pull-down”, que indican que LOXL2 interacciona con E47 en células que expresan establemente el factor E47 en forma de proteína de fusión (EGFP-E47) (Figura 16A) y en el sistema in vitro GST-E47 (Figura 16B), respectivamente. En este contexto es importante señalar que las células MDCK-EGFP-E47 han sufrido una TEM completa como consecuencia de la expresión estable de EGFP-E47 (Cubillo E., 2007; Cubillo et al., en preparación) de forma similar a lo descrito

previamente para las células MDCK-E47 (Pérez-Moreno et al, 2001). Estos resultados son similares a los descritos previamente por nuestro grupo sobre la interacción de LOXL2 con Snail1 modulando su actividad funcional (Peinado et al, 2005a). LOXL2 colocaliza con Snail1 en la zona perinuclear y favorece su estabilidad y por tanto su actividad transcripcional, siendo para ello necesarios dos residuos de lisina específicos (K98 y K137), localizados en la región de destrucción y de exporte nuclear (NES) de Snail1 (Peinado et al, 2005a). En nuestro estudio, quisimos analizar si los residuos de lisina del dominio *Rep* de E47, que participa en la represión de ciertos genes (Markus et al., 2002), están implicados en algún modo en la interacción y cooperación funcional con LOXL2. Los resultados obtenidos indican que las diferentes mutaciones de los residuos de lisina del dominio *Rep* no alteran la capacidad represora de E47 sobre el promotor de *cadherina-E* y que dichas mutaciones no afectan a la capacidad de colaboración entre LOXL2 y E47 (Figura 20). Por lo tanto, se puede concluir que, al contrario de lo que ocurre con Snail1, los residuos de lisina del dominio *Rep* de E47 no son necesarios para la colaboración de LOXL2 en la represión del promotor de *cadherina-E* mediada por E47. Nuestros análisis demuestran claramente que LOXL2 interacciona y puede colaborar con E47 en la represión de *cadherina-E*: los ensayos efectuados muestran que la actividad del promotor de *cadherina-E* disminuye como consecuencia de la acción de E47 y que esta represión aumenta en presencia de LOXL2 (Figura 18B, 18C). Además, nuestros datos indican que el dominio de transactivación AD1 de E47 no está implicado en la colaboración de LOXL2 en la represión de *cadherina-E*, (Figura 18C) y que esta colaboración también es independiente del dominio catalítico de LOXL2 (Figura 19). Estos resultados están de acuerdo con datos recientes de nuestro laboratorio, que describen que la actividad represora de LOXL2 sobre los promotores de varios genes epiteliales es independiente de su actividad catalítica (Moreno-Bueno et al, 2011; Pérez-Cuevas et al., en preparación), y corroboran la hipótesis de un papel intracelular para LOXL2. Estudiando la colaboración entre LOXL2 y E47 sobre la regulación de otros promotores de genes epiteliales, como el de *claudina1* (proteína de uniones estrechas) y el de *Lgl2* (proteína de polaridad celular), observamos que LOXL2 ejerce una fuerte represión sobre el promotor de *claudina1* y que dicha represión parece ser independiente de E47 (de hecho, E47 no reprime por si mismo este promotor) y del dominio catalítico de LOXL2 (Figura 21A), lo que confirma datos recientes de nuestro laboratorio en relación con la acción de Snail1 y LOXL2 sobre este promotor (Moreno-Bueno et al, 2011). Sin embargo, en el caso del promotor de *Lgl2*, los resultados obtenidos indican que E47 y LOXL2 podrían estar colaborando en la represión de dicho promotor, y que esta represión/colaboración es independiente del dominio catalítico de LOXL2 (Figura 21B). En conjunto, estos resultados indican, por un lado, que E47 y LOXL2 colaboran en la represión del promotor de *cadherina-E* y de *Lgl2*,

identificando así una nueva interacción funcional entre estas dos proteínas y extendiendo la implicación de E47 y LOXL2 en la regulación del proceso de TEM. Por otro lado, nuestros resultados apoyan un papel importante de LOXL2 *per se* en la represión de genes implicados en el mantenimiento de las uniones estrechas, como *Claudina1*, y evidencian que el papel intracelular de LOXL2 en la represión de ciertos genes, como *claudina1*, es independiente tanto de su actividad catalítica como de la presencia de otros factores como E47, de manera similar a lo observado con Snail1 (Moreno-Bueno et al., 2011).

Todavía quedan por identificar las regiones específicas de E47 que median la interacción con LOXL2: el hecho de que los dominios AD1 y *Rep* no estén implicados en la cooperación funcional a nivel de represión indica que probablemente hayan otras regiones por las que las dos proteínas puedan estar interaccionando/colaborando. Por otra parte, se conoce que las proteínas E2A pueden ejercer su activación transcripcional mediante el reclutamiento de proteínas con actividad acetil-transferasa de histonas: en los linfocitos B la actividad transcripcional de E2A se regula por la acción de p300, CBP y PCAF, asegurando de tal manera un correcto desarrollo de las células (Bradney et al, 2003). No se conoce hasta la fecha el reclutamiento de co-represores por las proteínas E2A. Sin embargo, el reclutamiento de complejos corepresores conteniendo histonas deacetilasas y demetilinasas se ha descrito para otros factores implicados en la TEM: así, Snail1 puede reclutar varios complejos co-represores como mSin3A/HDAC1/2, PolyComb o las proteínas Ajuba y LSD1 para reprimir la expresión de *cadherina-E* modificando la estructura de la cromatina (Peinado et al, 2004c; Herranz et al, 2008; Langer et al, 2008; Lin et al., 2010). También se ha descrito recientemente la interacción entre Snail2 y los complejos NCoR y CtBP1 (Molina-Ortiz et al., 2012), mientras que Zeb1 puede reclutar los co-represores CtBP1 y CtBP2 (Furusawa et al., 1999). Actualmente se desconoce si la interacción de LOXL2 con Snail1 o E47 puede modificar o favorecer el reclutamiento de complejos específicos de co-represión. Recientemente se ha descrito que LOXL2 puede tener una actividad deaminasa de la histona H3K4 trimetilada (Herranz et al., 2012), cuya relevancia biológica queda por establecer en base a nuestros resultados sobre la dispensabilidad del dominio catalítico para la represión de *cadherina-E* y otros genes epiteliales. Por lo tanto, no podemos descartar que la interacción funcional entre E47 y LOXL2 sea de tipo indirecto o bien mediada por complejos de co-represión todavía no caracterizados, para lo que serán necesarios estudios adicionales.

3. Papel de LOXL2 y E47 en la regulación del nicho pre-metastásico

3.1. Efecto del silenciamiento de LOXL2 y E47 sobre el crecimiento del tumor primario y el desarrollo de metástasis de células Eo771

Los resultados obtenidos en nuestros análisis muestran que el silenciamiento de LOXL2 y de E47 afecta de manera importante al crecimiento del tumor primario generado por las células de carcinoma de mama Eo771 (Figura 29). Estos resultados están de acuerdo con datos previos de nuestro laboratorio, que demostraron que el silenciamiento de LOXL2 en las líneas celulares HaCa4 y CarB, derivadas de carcinomas de células escamosas y de carcinomas fusiformes de piel de ratón, respectivamente, reduce el crecimiento del tumor primario generado tras la inyección de dichas líneas en ratones inmunodeficientes (Peinado et al., 2005a; Peinado et al., 2008a). Además, recientemente se ha demostrado que la interferencia de LOXL2 también afecta al crecimiento de tumores derivados de líneas de carcinoma gástrico (Peng et al., 2009). En modelos de cáncer de mama, se ha descrito que la inhibición de LOXL2 tiene el mismo efecto sobre el crecimiento de tumores primarios generados por la línea MDA-MB-435 (Barry-Hamilton et al., 2010), y datos más recientes de nuestro laboratorio han demostrado que la interferencia de LOXL2 afecta el crecimiento del tumor primario generado por la inyección de células de cáncer de mama con fenotipo basal (Moreno-Bueno et al., 2011).

Por otro lado, no existen muchos datos sobre el papel de E47 en el crecimiento del tumor primario, a excepción de los de nuestro grupo. Datos previos de nuestro laboratorio demuestran la inducción del crecimiento tumoral por las células MDCK-E47, mientras que el silenciamiento de E47 en las mismas células induce una reducción del crecimiento del tumor primario (Pérez-Moreno et al., 2001; Peinado et al., 2004b; Cubillo E., 2007; Cubillo et al., en preparación). Curiosamente, en el caso de las células MDCK-E47 el silenciamiento de E47 está asociado a una reversión del fenotipo celular, con re-expresión de *cadherina-E* y pérdida de expresión de marcadores mesenquimáticos (Cubillo E., 2007; Cubillo et al., en preparación), mientras que en el caso de las células Eo771 esta reversión no ocurre. Estos datos sugieren que el factor E47 puede tener papeles diferenciales en relación a la represión de *cadherina-E* y el fenotipo dependiendo del contexto celular. Los resultados de esta tesis corroboran de todas formas los análisis de expresión de E47 en líneas celulares tumorales realizados por nuestro grupo: estos análisis evidenciaron una mayor expresión de E47 en las líneas más invasivas y tumorogénicas de carcinomas y melanomas (Pérez-Moreno et al, 2001). Por otra parte, los resultados obtenidos en el modelo de carcinogénesis química (discutidos en el apartado 1) también apoyan un papel de las proteínas E2A en la inducción de la tumorogénesis, si bien en este caso no se puede discriminar entre la acción específica de E47 y E12.

Un aspecto interesante puesto de manifiesto en el presente estudio es la aparente regulación cruzada entre LOXL2 y E47 que se detecta en los tumores primarios: el análisis de los niveles de mRNA sugiere que hay una regulación positiva cruzada entre los dos genes, ya que cuando se silencia E47 bajan los niveles de mRNA de LOXL2, y viceversa (Figura 35A, 35B). Una situación similar para LOXL2 ocurre a nivel de proteína en los cultivos celulares donde el silenciamiento de E47 disminuye aparentemente los niveles de LOXL2, sin afectar a los niveles de mRNA, mientras que el silenciamiento de LOXL2 no afecta la expresión de mRNA o proteína de E47 (Figura 23). Estas observaciones sugieren diferentes niveles de regulación entre ambas moléculas, lo que resulta particularmente interesante, sobre todo considerando que hemos identificado por primera vez una interacción entre estas proteínas, además de su cooperación funcional en la represión de los promotores de *cadherina-E* y *Lgl2*. Además, esta regulación cruzada parece estar influenciada por el entorno tumoral, indicando que E47 y LOXL2 podrían estar actuando de manera sinérgica en el contexto del tumor primario.

En el modelo de células Eo771 la capacidad de metástasis de las células se vio afectada de manera importante por la interferencia de LOXL2 y de E47. El análisis de diferentes órganos *ex-vivo* mostró que los ratones inyectados con células Eo771shLOXL2 y Eo771shE47 tienen mucha menor capacidad de generar metástasis espontánea a pulmón comparado con los ratones control, siendo este efecto más acusado en las células Eo771shLOXL2 (Figura 30A). Se ha documentado un papel importante para LOXL2 en la diseminación de metástasis en varios modelos celulares, como en cáncer gástrico donde el silenciamiento de LOXL2 inhibe de manera importante la formación de metástasis espontáneas a pulmón (Peng et al., 2009), así como en otros modelos de carcinomas de mama (Baker et al., 2011b). En varios modelos de cáncer de mama se ha demostrado que la inhibición de la actividad enzimática de LOXL2 mediante anticuerpos específicos afecta el desarrollo de metástasis, lo que corrobora el papel para LOXL2 extracelular en el desarrollo del microambiente tumoral (Barker et al., 2011b, Barry-Hamilton et al., 2010). Por otra parte, LOXL2 se ha caracterizado como marcador de mal pronóstico en carcinomas de células escamosas de laringe y pulmón (Peinado et al., 2008), y estudios recientes de nuestro laboratorio en carcinomas de mama han mostrado que la sobreexpresión del LOXL2 con un patrón perinuclear se asocia a carcinomas de fenotipo basal y se relaciona significativamente con la incidencia de metástasis a distancia (Moreno-Bueno et al., 2011). Curiosamente, estudios de nuestro laboratorio muestran que E47 también está sobre-expresado en los carcinomas de fenotipo basal, lo que corrobora la hipótesis de una colaboración entre LOXL2 y E47 en la progresión tumoral (Moreno-Bueno et al., 2011; Cubillo, 2007; Cubillo et al., en preparación).

Muchos de los trabajos mencionados anteriormente atribuyen a la actividad enzimática de LOXL2 y a su localización extracelular el papel que esta proteína desempeña en la progresión tumoral (Peng et al., 2009; Barry-Hamilton et al., 2010; Barker et al., 2011b). Sin embargo, las células Eo771 no secretan LOXL2 al medio condicionado, lo que apoya que el efecto de inhibición de las metástasis de LOXL2 en este modelo se deba a su función intracelular, probablemente mediado a nivel transcripcional, si bien no se puede descartar la secreción de LOXL2 en el contexto tumoral. No obstante, los ensayos de metástasis experimental por inyección en la vena de la cola demostraron que la interferencia de LOXL2 y E47 afecta significativamente a la capacidad metastásica de las células Eo771 también en ausencia de tumor primario (Figura 31), lo que puede indicar que LOXL2 y E47 podrían estar regulando el anidamiento de las células metastásicas.

Por otro lado, y sorprendentemente, los ratones inyectados con células Eo771shE47 mostraron un notable incremento de metástasis a hueso (Figura 30B), no observándose cambios en las metástasis óseas en los ratones inyectados con células Eo771shLOXL2 respecto a los controles. Se ha demostrado que la capacidad de las células tumorales de mama de formar metástasis óseas requiere la producción de factores como PTHrP (*Parathyroid hormone-related protein*), IL-6, IL-11, TNF α o GM-CSF, que actúan promoviendo la activación de los osteoclastos y la creación de un entorno favorable para el desarrollo de las metástasis (Yin et al., 1999 Mundy, 2002; Kang et al., 2003; Park et al., 2007; revisado en Nguyen et al., 2009). Nuestros datos muestran que tras el silenciamiento de E47 en las células Eo771 los niveles de TNF α y GM-CSF caen bruscamente tanto en los cultivos celulares como en los tumores primarios, mientras los de otros factores, como TGF β , no se ven afectados (Figuras 40 y 41). Estos datos sugieren que, por un lado, en el modelo celular Eo771 las citoquinas TNF α y GM-CSF son dispensables para la generación de las metástasis óseas y, por otro lado, que probablemente el silenciamiento de E47 esté induciendo la expresión de algún otro gen o proteína que regula positivamente las metástasis óseas. PTHrP, IL-6, IL-8, IL-11 y osteopontina podrían ser algunos candidatos importantes, ya que su expresión se ha asociado con una alta incidencia de metástasis en hueso en varios modelos de cáncer de mama (Bendre et al., 2002; Kang et al., 2003; Guise et al., 2005). Recientemente se ha descrito que en el microambiente del hueso, la proteína *Jagged-1* secretada por el tumor primario activa la vía de Notch en los osteoblastos y en los osteoclastos, lo que confiere ventajas selectivas para el crecimiento de las células metastásicas (Sethi and Kang, 2011b). También se ha demostrado que TGF β regula la expresión de *Jagged-1* durante la metastatización a hueso de células de cáncer de mama (Korpál et al., 2009). Curiosamente, el silenciamiento de E47 en las células Eo771 no afecta los niveles de expresión de TGF β en los cultivos, tumores primarios ni pulmones, aunque sus

niveles no son más altos comparados con las células Eo771shControl o Eo771shLOXL2 (Figuras 40-42). Se podría especular que el TGF β por un lado y la inducción de alguna proteína mediada por el silenciamiento de E47 por otro lado, estén actuando para favorecer la formación de metástasis óseas, aunque esta hipótesis tendría que ser analizada en futuros estudios

3.2. Papel de LOXL2 y E47 en el reclutamiento de células precursoras de la médula ósea y en la formación del nicho pre-metastásico

El proceso de formación del nicho pre-metastásico se regula por precursores de células derivadas de médula ósea, que son reclutados a los sitios de metástasis y son capaces de crear un entorno favorable para la invasión y el crecimiento de las células tumorales (Kaplan et al., 2006). En este contexto, las poblaciones de células precursoras hematopoyéticas HPCs (c-kit⁺/Sca-1⁺) y las células de linaje mieloide (CD11b⁺/Gr-1⁺) juegan un papel fundamental, siendo las primeras en movilizarse y en ser reclutadas a los sitios de metástasis (Kaplan et al., 2005). Nuestros resultados muestran que el silenciamiento de LOXL2 y de E47 en las células Eo771 afecta a la movilización y al reclutamiento de las células HPCs pero no al de las células mieloides (Figuras 32 y 33). Los resultados obtenidos en los experimentos de trasplante de médula ósea corroboran que el silenciamiento de ambos genes disminuye significativamente el reclutamiento de BMDCs a los pulmones (Figura 34). Estas observaciones, junto a la significativa inhibición de la metástasis pulmonar tras el silenciamiento de ambos genes, indican que las proteínas LOXL2 y E47 regulan la formación del nicho pre-metastásico y la generación de micrometástasis. Es importante destacar que en este contexto las células HPCs parecen jugar un papel más importante que las células de linaje mieloide: estas últimas son movilizadas a la sangre y reclutadas al pulmón, pero a pesar de ello no son suficientes para reclutar eficientemente células tumorales, y por tanto generar metástasis, a partir de los tumores primarios generados en los ratones inyectados con células Eo771-shLOXL2 y -shE47. Por lo tanto podemos afirmar que en el modelo de las células Eo771 las células del linaje mieloide no juegan un papel predominante en la formación del nicho pre-metastásico, y que las células HPCs parecen ser las responsables de la formación del nicho y/o del reclutamiento de las metástasis pulmonares. Muchos trabajos han puesto de manifiesto que el acúmulo de células mieloides CD11b⁺/Gr1⁺ en el microambiente metastásico puede promover la formación de vasos sanguíneos, y existen numerosas evidencias de que estas células tienen actividad inmunosupresora y anti-inflamatoria (Zou W, 2005; Shojaei et al., 2007; Yang and Moses, 2008; Wels et al., 2010; Ye et al., 2010). Una hipótesis para explicar nuestros resultados es que las células HPCs serían indispensables para los estadios más tempranos de formación del nicho y para la formación de micrometástasis, como se ha demostrado en estudios anteriores (Kaplan

et al., 2005), mientras que las células mieloides CD11b⁺/Gr1⁺ podrían estar implicadas en procesos más tardíos y que implicarían sus funciones pro-angiogénicas, inmunosupresoras y/o anti-inflamatorias.

Según trabajos recientes de varios grupos, los tumores primarios secretan una serie de citoquinas y quimioquinas (como TNF α , TGF β , o VEGF-A) que inducen la secreción de las citoquinas S100A8 y S100A9 en los pulmones, lo que a su vez estimula y facilita el reclutamiento de células CD11b⁺ de la médula ósea (Hiratsuka et al., 2006; Ye et al., 2010). En el modelo de células Eo771, el silenciamiento de LOXL2 y de E47 inhibe la expresión de mRNA de TNF α en las líneas celulares y en los tumores primarios, mientras que la expresión de mRNA de TGF β se mantiene inalterada (Figuras 40 y 41). Significativamente, en los pulmones de los ratones inyectados con células shLOXL2 y shE47 apenas se detecta expresión de mRNA de S100A8 y S100A9 (Figura 42). Sin embargo, en estos pulmones, se siguen detectando altos niveles de células mieloides CD11b⁺/Gr1⁺ infiltradas (Figura 33), lo que parece contradecir datos previos de la literatura. Nuestros datos parecen indicar que S100A8 y S100A9 no juegan un papel importante en el reclutamiento de las células CD11b⁺ en el modelo celular Eo771. Recientemente, otro miembro de la familia S100 (S100A4) ha sido implicado en la formación de metástasis pulmonares (Grum-Schwensen et al., 2010; Spano and Zollo, 2012) y podría, en principio, contribuir a la metástasis de células Eo771. Tampoco podemos descartar que en este sistema la secreción de TGF β por parte de las células del tumor primario y/o en el pulmón esté induciendo alguna otra vía que finalmente facilite la infiltración de las células mieloides CD11b⁺/Gr1⁺. Por otra parte, nuestros datos sugieren que es muy probable que la inhibición de la secreción de las citoquinas S100A8 y S100A9 en el pulmón como consecuencia del silenciamiento de LOXL2 y de E47 esté afectando al reclutamiento de las células HPCs y la formación de micrometástasis, lo que confirma la implicación de estas citoquinas en la formación del nicho pre-metastásico (Hiratsuka et al., 2006).

Recientemente se ha descrito que el reclutamiento de las células mieloides para la formación del nicho pre-metastásico pulmonar en cáncer de mama depende de la actividad enzimática de LOX (Erler et al., 2009). Además, la inhibición de la secreción de LOX en células humanas de carcinoma de mama es capaz de inhibir el reclutamiento de células mieloides a los órganos premetastásicos ralentizando así el proceso metastático (Erler et al., 2009). Nuestros resultados muestran que tanto en los tumores primarios como en los pulmones se induce la expresión de LOX tras el silenciamiento de LOXL2 y de E47, lo que podría contribuir al reclutamiento de las células mieloides detectadas en los pulmones. A pesar de todo, este mecanismo no parece ser capaz de inducir la formación de micrometástasis, lo que indica que

en el modelo celular Eo771 la función de LOX es dispensable para la formación de micrometástasis.

3.3. Efecto del silenciamiento de LOXL2 y E47 en la expresión de factores de la matriz extracelular implicados en la formación del nicho metastásico

En el proceso de formación del nicho pre-metastásico las células del tumor primario secretan quimioquinas y factores que condicionan los órganos secundarios y determinan el patrón de diseminación de las células metastásicas (Kaplan et al., 2006). Nuestros datos ponen de manifiesto que el silenciamiento de LOXL2 y de E47 afecta a la expresión de algunos de estos factores, tanto en las líneas celulares como en las células del tumor primario (Figuras 23 y 35). Por ejemplo, la interferencia de LOXL2 y de E47 en las células Eo771 disminuye significativamente la expresión de fibronectina, y no hemos sido capaces de detectar fibronectina en los pulmones de los ratones inyectados con células shLOXL2 o shE47 (Figura 38). Vale la pena recordar que se ha demostrado que las células HPCs son reclutadas preferentemente a zonas ricas en fibronectina en los órganos secundarios, debido a que expresan en su superficie la integrina $\alpha 4\beta 1$, un receptor preferente de la fibronectina (Kaplan et al., 2005), lo que apoya nuestros resultados. Además, el acúmulo de fibronectina no solo es un factor crítico en la regulación de la formación del nicho pre-metastásico, sino que las matrices ricas en fibronectina contribuyen a formar un microambiente para la regulación de la actividad catalítica de LOX (Fogelgren et al., 2005), y se ha visto una relación directa entre la secreción de fibronectina y la actividad de la enzima LOX en el nicho pre-metastásico (Erler et al., 2009). Por lo tanto, nuestra hipótesis es que LOXL2 y E47 regulan de alguna manera la expresión de fibronectina, sobrepasando incluso el efecto activador de LOX, y que esta regulación sea responsable, al menos parcialmente, del reclutamiento de las HPCs y de la formación de micrometástasis pulmonares. Estudios recientes en líneas de carcinoma de mama han puesto de manifiesto que otra molécula de matriz extracelular, tenascina-C (TEN-C), es secretada por las células tumorales actuando como mediador de la formación de nicho pre-metastásico, lo que favorece la iniciación de la colonización pulmonar por parte de las células del tumor primario (Matei et al., 2011; Oskarsson et al., 2011). Sin embargo, en el modelo celular Eo771 el silenciamiento de LOXL2 o de E47 no afecta a los niveles de mRNA de TEN-C, lo que parece indicar que en este modelo la presencia de TEN-C es dispensable para la formación del nicho pre-metastásico y el reclutamiento de las metástasis tumorales.

Nuestros análisis indican que el silenciamiento de LOXL2 y de E47 induce la expresión de otros miembros de la familia de las lisil oxidasas, más específicamente LOX y LOXL3, tanto en los cultivos celulares como en los tumores primarios y en los pulmones analizados (Figuras 27,

35B, D y 36B, D). La secreción de la enzima LOX permite modificar la matriz extracelular al unirse a fibronectina y favorecer la formación de enlaces covalentes en las fibras de colágeno, lo que la hace más receptiva para la infiltración de células mieloides facilitando así el reclutamiento de células del tumor primario a los sitios de metástasis (Erler et al., 2009). Sin embargo, nuestros datos ponen de manifiesto que a pesar de que se induzca la expresión de LOX, su presencia no es suficiente para favorecer la formación de micrometástasis: esto podría ser debido a la ausencia de fibronectina en los pulmones como consecuencia de la interferencia de LOXL2 o E47, lo que podría impedir la actividad funcional de LOX en la matriz extracelular en esta situación. En conjunto, los resultados del presente estudio corroboran que LOXL2 juega un papel dominante con respecto a LOX, en la formación del nicho y generación de metástasis en el modelo celular Eo771. Recientemente, se ha descrito que en condiciones de hipoxia, células de cáncer de mama humanas secretan altos niveles de LOX, y LOXL4, o bien LOXL2, dependiendo del tipo celular concreto, lo que favorece la infiltración de BMDCs a los pulmones y la consecuente colonización por parte de las células metastásicas (Wong et al., 2011). De hecho, se ha demostrado también que la inhibición de HIF1 α , el principal responsable de la hipoxia intra-tumoral, es capaz de bloquear la expresión de LOX o LOXL4, y el consecuente reclutamiento de BMDCs a los sitios metastásicos (Wong et al., 2012). Hay que destacar que los trabajos mencionados se basan en estudios realizados en condiciones de hipoxia, mientras que nuestros estudios han sido realizados en condiciones de normoxia. Obviamente, no podemos descartar que existan condiciones de hipoxia intra-tumoral en los tumores generados por las células Eo771 que puedan influir en la expresión de LOX o LOXL3 observada, pero no hemos realizado los estudios requeridos para aclarar este aspecto. Por otro lado, no existen actualmente datos que hayan relacionado la LOXL3 con la formación del nicho pre-metastásico. Nuestros datos muestran que la inhibición de la expresión de LOXL2 induce de manera sistemática la expresión de LOXL3, a nivel de mRNA en los tumores primarios y metástasis pulmonar, así como a nivel de proteína en los cultivos celulares, por lo que se podría pensar en algún mecanismo de compensación entre las dos proteínas en las células Eo771. No obstante, la inducción de LOXL3 no compensa la ausencia de LOXL2 en este modelo, siendo insuficiente para la formación del nicho y de micrometástasis, al igual que ocurre en el caso de LOX.

En conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan un papel importante de LOXL2 y de E47 en el reclutamiento de las células HPCs y la formación de micrometástasis (Figura 43), pero queda todavía por identificar cuál es el mecanismo específico de acción de estas proteínas en la regulación de la formación del nicho pre-metastásico. Recientemente, se ha demostrado un papel importante de los exosomas en la

progresión tumoral y varios estudios están poniendo de manifiesto la participación de estas micro-vesículas en la creación de un microambiente favorable para el tumor (Muralidharan-Chari et al., 2010; revisado en Peinado et al., 2011). Los exosomas no sólo influyen en el crecimiento del tumor primario, sino que también participan en el traslado de material entre el tumor y las células endoteliales, estromales o de la médula ósea (Cocucci et al., 2009; Aliotta et al., 2010; Nazarenko et al., 2010). Además, se ha demostrado recientemente que los exosomas secretados por el tumor primario pueden influenciar la diferenciación de las BMDCs, habiéndose demostrado un papel de los exosomas en la formación del nicho pre-metastásico en modelos de cáncer de próstata o de páncreas (Castellana et al., 2009; Jung et al., 2009; Xiang et al., 2009). Vale la pena recordar que las células Eo771, analizadas en el presente trabajo, no secretan LOXL2 al medio condicionado (Figura 27C), lo que apoya un papel para la proteína intracelular. LOXL2 podría, no obstante, acumularse en los exosomas secretados por el tumor primario, y así influenciar los órganos secundarios, o podría estar educando las BMDCs para su reclutamiento a los sitios metastásicos, contribuyendo de tal manera a la progresión tumoral y al desarrollo de las metástasis, como ya se ha demostrado en otros modelos (Peinado et al., 2012). Muy recientemente se ha demostrado que las células endoteliales en condiciones de hipoxia secretan exosomas que contienen altos niveles de LOXL2, comparado con las mismas células en condiciones normales (de Jong et al., 2012), lo que apoya nuestra hipótesis y supone una base para el estudio del contenido de los exosomas secretados por las células Eo771.

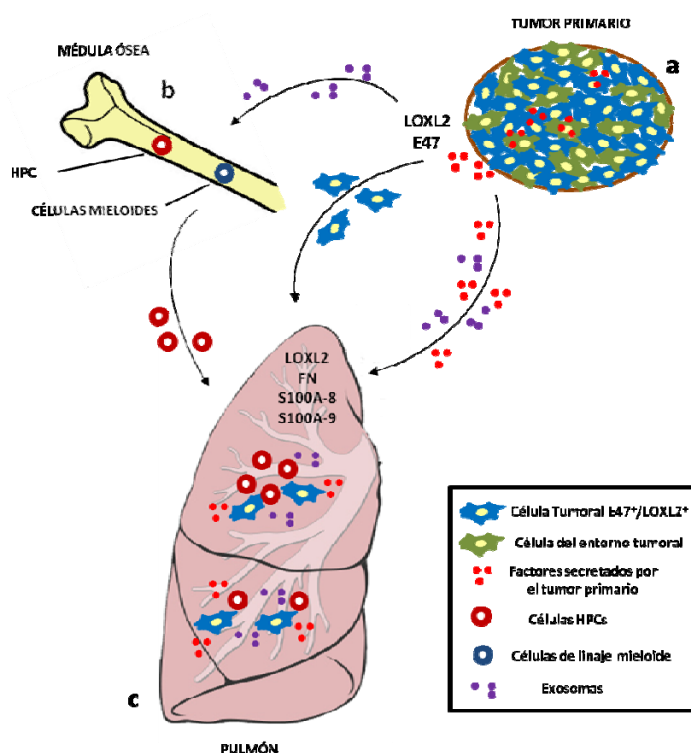


FIGURA 43: Modelo de la implicación de LOXL2 y E47 en la formación del nicho premetastático. a) LOXL2 y E47 en las células del tumor primario regulan la transcripción de varios factores de crecimiento implicados en la formación del nicho pre-metastático (TNF α = Factor de necrosis tumoral α ; GM-CSF= Factor de estimulación de colonias de granulocitos y monocitos; ANG-1= angiopietina-1) e inducen en el pulmón la sobreexpresión de quimioquinas y citoquinas (Fibronectina, S100A8, S100A9) **(c)**. Este mecanismo induce el reclutamiento de las células precursora hematopoyéticas (HPCs) de la médula ósea **(b)** y la formación de micrometástasis pulmonares **(c)**. LOXL2 contenida en los exosomas secretados por el tumor primario también podría contribuir al reclutamiento de células HPCs y favorecer la formación de micrometástasis pulmonares.

CONCLUSIONES

1. La delección del gen *E2A* disminuye el número de lesiones en la piel de ratones tratados con DMBA/TPA, mientras favorece la progresión maligna de dichas lesiones;
2. Las proteínas E47 y LOXL2 interaccionan *in vivo* e *in vitro* y co-localizan en la zona perinuclear de la célula;
3. Las proteínas E47 y LOXL2 colaboran en la represión de la actividad del promotor de *cadherina-E*; dicha represión es independiente del dominio de transactivación AD1 de E47 y del dominio catalítico de LOXL2;
4. El silenciamiento de E47 y de LOXL2 en células de carcinoma de mama de ratón (Eo771) afecta negativamente el crecimiento del tumor y el desarrollo de metástasis pulmonares; el silenciamiento de E47 en las mismas células induce la formación de metástasis óseas;
5. La expresión de E47 y LOXL2 se requiere para la movilización y el reclutamiento eficiente de células precursoras hematopoyéticas (HPCs) a pulmón, y para la formación del nicho pre-metastático por células Eo771 de cáncer de mama.
6. LOXL2 juega un papel predominante sobre LOX en la formación del nicho pre-metastático y la generación de micrometástasis en el modelo celular Eo771 de carcinoma de mama.

CONCLUSIONS

1. *E2A* gene deletion decreases the number of skin lesions in DMBA/TPA treated mice, while it triggers the progression of benign papilomas to squamous cell carcinomas
2. E47 and LOXL2 proteins interact *in vivo* and *in vitro* and they co-localize in the cellular perinuclear region;
3. E47 and LOXL2 proteins collaborate in the repression of the *E-cadherin* promoter activity; this collaboration is independent on either the AD1 domain of E47 or the catalytic domain of LOXL2;
4. Silencing of either E47 or LOXL2 in mouse breast carcinoma cell line Eo771 negatively affect tumor growth and lung metastasis, while silencing of E47 induces bone metastasis;
5. The expression of E47 and LOXL2 is required for the mobilization and the efficient recruitment of Hematopoietic Progenitor Cells (HPCs) to the lungs and for the formation of the pre-metastatic niche induced by Eo771 breast carcinoma cells;
6. LOXL2 plays a predominant role on LOX in the formation of the pre-metastatic niche and in the generation of micrometastasis induced by Eo771 breast carcinoma cells.

BIBLIOGRAFIA

- Akiri G, Sabo E, Dafni H, Vadasz Z, Kartvelishvily Y, Gan N, Kessler O, Cohen T, Resnick M, Neeman M, Neufeld G, 2003. Lysyl oxidase-related protein-1 promotes tumor fibrosis and tumor progression in vivo. *Cancer Res*, 63:1657-1666. Erratum in: *Cancer Res*. 2004 64:2306.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J et al., 1996. *Molecular biology of the cell*. Ed Omega, S.A.Barcelona.
- Aliotta JM, Pereira M, Johnson KW, de Paz N, Dooner MS, Puente N, Ayala C, Brilliant K, Berz D, Lee D, Ramratnam B, McMillan PN, Hixson DC, Josic D, Quesenberry PJ, 2010. Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription. *Exp Hematol*, 38: 233-45.
- Aronheim A, Shiran R, Rosen A, Walker MD, 1993. The E2A gene product contains two separable and functionally distinct transcription activation domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8063-8067.
- Aslakson CJ, Miller FR, 1992. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res*, 52: 1399-405.
- Bain G, Maandag EC, Izon DJ, Amsen D, Kruisbeek AM, Weintraub BC, Krop I, Schlissel MS, Feeney AJ, van Roon M, van der Valk M, te Riele HPJ, Berns A and Murre C, 1994. E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell*, 79: 885-92.
- Bain G, Engel I, Robanus Maandag EC, te Riele HP, Volland JR, Sharp LL, Chun J, Huey B, Pinkel D and Murre C, 1997. E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol Cell Biol*, 17: 4782-91.
- Bain G, Cravatt CB, Loomans C, Alberola-Ila J, Hedrick SM, Murre C, 2001. Regulation of the helix-loop-helix proteins, E2A and Id3, by the Ras-ERK MAPK cascade. *Nat Immunol*, 2: 165-71.
- Bais MV, Nugent MA, Stephens DN, Sume SS, Kirsch KH, Sonenshein GE, Trackman PC, 2012. Recombinant lysyl oxidase propeptide protein inhibits growth and promotes apoptosis of pre-existing murine breast cancer xenografts. *PLoS One*, 7: e31188.

- Balmain A, Ramsden M, Bowden GT, Smith J, 1984. Activation of the mouse cellular Harvey-ras gene in chemically induced benign skin papillomas. *Nature*, 307: 658-60.
- Baker AM, Cox TR, Bird D, Lang G, Murray GI, Sun XF, Southall SM, Wilson JR, Erler JT, 2011. The role of lysyl oxidase in SRC-dependent proliferation and metastasis of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*, 103:407-24.
- Barker HE, Erler JT, 2011a. The potential for LOXL2 as a target for future cancer treatment. *Future Oncol*, 7: 707-10.
- Barker HE, Chang J, Cox TR, Lang G, Bird D, Nicolau M, Evans HR, Gartland A, Erler JT, 2011b. LOXL2-mediated matrix remodeling in metastasis and mammary gland involution. *Cancer Res*, 71: 1561-72.
- Barndt RJ, Zhuang Y, 1999. Controlling lymphopoiesis with a combinatorial E-protein code. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 64: 45-50.
- Barry-Hamilton V, Spangler R, Marshall D, McCauley S, Rodriguez HM, Oyasu M, Mikels A, Vaysberg M, Ghermazien H, Wai C, Garcia CA, Velayo AC, Jorgensen B, Biermann D, Tsai D, Green J, Zaffryar-Eilot S, Holzer A, Ogg S, Thai D, Neufeld G, Van Vlasselaer P, Smith V, 2010. Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat Med*, 16: 1009-17.
- Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García De Herreros A, 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*. 2: 84-9.
- Beck K, Peak MM, Ota T, Nemazee D, Murre C, 2009. Distinct roles for E12 and E47 in B cell specification and the sequential rearrangement of immunoglobulin light chain loci. *J Exp Med*, 206: 2271-84.
- Behrens J, Lowrick O, Klein-Hitpass L and Birchmeier W, 1991. The E-cadherin promoter: functional analysis of a GC-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 130-5.
- Bendre MS, Gaddy-Kurten D, Mon-Foote T, Akel NS, Skinner RA, Nicholas RW, Suva LJ, 2002. Expression of interleukin 8 and not parathyroid hormone-related protein by

- human breast cancer cells correlates with bone metastasis in vivo. *Cancer Res*, 62: 5571-9.
- Benezra R, Rafii S, Lyden D, 2001. The Id proteins and angiogenesis. *Oncogene* 20, 8334-41.
 - Berkes CA, Tapscott SJ, 2005. MyoD and the transcriptional control of miogénesis. *Semin Cell Dev Biol*, 16: 585-95.
 - Bertrand N, Castro DS and Guillemot F, 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci*, 3: 517-30.
 - Bianchi AB, Aldaz CM and Conti CJ, 1990. Nonrandom duplication of the chromosome bearing a mutated Ha-ras-1 allele in mouse skin tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 6902-6.
 - Blanpain C, Fuchs E, 2006. Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22: 339-73.
 - Blanpain C, Fuchs E, 2009. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 207-17.
 - Boehnke K, Falkowska-Hansen B, Stark HJ, Boukamp P, 2012. Stem cells of the human epidermis and their niche: composition and function in epidermal regeneration and carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2012 Apr 25. [Epub ahead of print].
 - Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A, 2003. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci*. 116: 499-511.
 - Boutwell RK, 1974. The function and mechanism of promoters of carcinogenesis. *CRC Crit Rev Toxicol*, 2: 419-443.
 - Bradney C, Hjelmeland M, Komatsu Y, Yoshida M, Yao TP, Zhuang Y, 2003. Regulation of E2A activities by histone acetyltransferases in B lymphocyte development. *J Biol Chem*. 278: 2370-76.

- Brown K, Quintanilla M, Ramsden M, Kerr IB, Young S, Balmain A, 1986. v-ras genes from Harvey and BALB murine sarcoma viruses can act as initiators of two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cell*, 46: 447-56.
- Brown K and Balmain A, 1995. Transgenic mice and squamous multistage skin carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev*, 14: 113-24.
- Burg G, Kempf W, Cozzio A, Feit J, Willemze R, S Jaffe E, Dummer R, Berti E, Cerroni L, Chimenti S, Diaz-Perez JL, Grange F, Harris NL, Kazakov DV, Kerl H, Kurrer M, Knobler R, Meijer CJ, Pimpinelli N, Ralfkiaer E, Russell-Jones R, Sander C, Santucci M, Sterry W, Swerdlow SH, Vermeer MH, Wechsler J, Whittaker S, 2005. WHO/EORTC classification of cutaneous lymphomas 2005: histological and molecular aspects. *J Cutan Pathol*, 32: 647-74.
- Burns PA, Kemp CJ, Gannon JV, Lane DP, Bremner R and Balmain A, 1991. Loss of heterozygosity and mutational alterations of the p53 gene in skin tumours of interspecific hybrid mice. *Oncogene*, 6:2363-9.
- Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA, 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*. 2:76-83.
- Cano A and Portillo F, 2009. An emerging role for class I bHLH E2-2 proteins in EMT regulation and tumor progression. *Cell Adh Migr*, 4: 1-5.
- Cano A, Moreno-Bueno G, Santamaria PG., 2012. LOXL2 in epithelial cell plasticity and tumor progression. *Future Oncology (In Press)*.
- Casas E, Kim J, Bendesky A, Ohno-Machado L, Wolfe CJ, Yang J, 2011. Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res*, 71: 245-54.
- Castellana D, Zobairi F, Martinez MC, Panaro MA, Mitolo V, Freyssinet JM, Kunzelmann C, 2009. Membrane microvesicles as actors in the establishment of a favorable prostatic tumoral niche: a role for activated fibroblasts and CX3CL1-CX3CR1 axis. *Cancer Res*, 69: 785-93.

- Caulín C, Bauluz C, Gandarillas A, Cano A, Quintanilla M, 1993. Changes in keratin expression during malignant progression of transformed mouse epidermal keratinocytes. *Exp Cell Res*, 204: 11-21.
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC, 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2: 563-72.
- Chomczynski P, Sacchi N, 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem*. 162: 156-9.
- Chung CH, Parker JS, Ely K, Carter J, Yi Y, Murphy BA, Ang KK, El-Naggar AK, Zanation AM, Cmelak AJ, Levy S, Slebos RJ, Yarbrough WG, 2006. Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappaB signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 66: 8210-18.
- Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J, 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*, 19: 43-51.
- Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F, 2001. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 7: 1267-78.
- Csiszar K 2001. Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 70:1-32.
- Cubillo E., 2007. Implicación de los factores HLH E47 y Id en la regulación transcripcional de cadherina-E y en la transición epitelio-mesénquima durante la progresión tumoral. Tesis Doctoral UAM.
- Cui W, Kemp CJ, Duffie E, Balmain A, Akhurst RJ, 1994. Lack of transforming growth factor-beta 1 expression in benign skin tumors of p53 null mice is prognostic for a high risk of malignant conversion. *Cancer Res*, 54: 5831-6.
- Davis RL, Cheng PF, Lassar AB, Weintraub H, 1990. The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell*, 60: 733-46.
- Dexter DL, Kowalski HM, Blazar BA, Fligiel Z, Vogel R, Heppner GH, 1978. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res*, 38: 3174-81.

- Ephrussi A, Church GM, Tonegawa S and Gilbert W, 1985. B-lineage specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo. *Science*, 227: 134-40.
- Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhöfer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS, Giaccia AJ, 2006. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*, 440: 1222-6.
- Erler JT, Bennewith KL, Cox TR, Lang G, Bird D, Koong A, Le QT, Giaccia AJ, 2009. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell*, 15: 35-44.
- Ewens A, Mihich E, Ehrke MJ, 2005. Distant metastasis from subcutaneously grown E0771 medullary breast adenocarcinoma. *Anticancer Res*, 25: 3905-15.
- Ewing MW, Conti CJ, Kruszewski FH, Slaga TJ, DiGiovanni J, 1988. Tumor progression in Sencar mouse skin as a function of initiator dose and promoter dose, duration, and type. *Cancer Res*, 48: 7048-54.
- Faraldo ML, Rodrigo I, Behrens J, Birchmeier W, Cano A, 1997. Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in mouse keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog*, 20: 33-47.
- Feres-Filho EJ, Choi YJ, Han X, Takala TE, Trackman PC, 1995. Pre- and post-translational regulation of lysyl oxidase by transforming growth factor-beta 1 in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem*, 270: 30797-803.
- Fidler IJ, 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3: 453-8.
- Fogelgren B, Polgár N, Szauter KM, Ujfaludi Z, Laczkó R, Fong KS, Csiszar K, 2005. Cellular fibronectin binds to lysyl oxidase with high affinity and is critical for its proteolytic activation. *J Biol Chem*, 280: 24690-7.
- Fong SF, Dietzsch E, Fong KS, Hollosi P, Asuncion L, He Q, Parker MI, Csiszar K, 2007. Lysyl oxidase-like 2 expression is increased in colon and esophageal tumors and associated with less differentiated colon tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 46: 644-55.

- Fuchs E, Green H, 1980. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*, 19: 1033-42.
- Fuchs E, 1990. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol*, 111: 2807-14.
- Fuchs E, 2009. Finding one's niche in the skin. *Cell Stem Cell*, 4: 499-502.
- Furusawa T, Moribe H, Kondoh H, Higashi Y, 1999. Identification of CtBP1 and CtBP2 as corepressors of zinc finger-homeodomain factor deltaEF1. *Mol Cell Biol*, 19: 8581-90.
- Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V, 2008. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science*, 319: 195-8.
- Giampuzzi M, Botti G, Di Duca M, Arata L, Ghiggeri G, Gusmano R, Ravazzolo R, Di Donato A, 2000. Lysyl oxidase activates the transcription activity of human collagen III promoter. Possible involvement of Ku antigen. *J Biol Chem*, 275: 36341-9.
- Giménez-Conti I, Aldaz CM, Bianchi AB, Roop DR, Slaga TJ, Conti CJ, 1990. Early expression of type I K13 keratin in the progression of mouse skin papillomas. *Carcinogenesis*, 11:1995-9.
- Goardon N, Lambert JA, Rodriguez P, Nissaire P, Herblot S, Thibault P, Dumenil D, Strouboulis J, Romeo PH, Hoang T, 2006. ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *EMBO J*, 25: 357-66.
- Gómez M, Navarro P, Quintanilla M, Cano A, 1992. Expression of alpha 6 beta 4 integrin increases during malignant conversion of mouse epidermal keratinocytes: association of beta 4 subunit to the cytokeratin fraction. *Exp Cell Res*, 201: 250-61.
- Gómez M, Navarro P, Cano A, 1994. Cell adhesion and tumor progression in mouse skin carcinogenesis: increased synthesis and organization of fibronectin is associated with the undifferentiated spindle phenotype. *Invasion Metastasis*, 14: 17-26.
- Gómez M and Cano A, 1995. Expression of beta 1 integrin receptors in transformed mouse epidermal keratinocytes: upregulation of alpha 5 beta 1 in spindle carcinoma cells. *Mol Carcinog*, 12: 153-65.

- Görögh T, Weise JB, Holtmeier C, Rudolph P, Hedderich J, Gottschlich S, Hoffmann M, Ambrosch P, Csiszar K, 2007. Selective upregulation and amplification of the lysyl oxidase like-4 (LOXL4) gene in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol*, 212: 74-82.
- Greenbaum S and Zhuang Y, 2002. Identification of E2A target genes in B lymphocyte development by using a gene tagging-based chromatin immunoprecipitation system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 15030-5.
- Grooteclaes ML, Frisch SM, 2000. Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene*, 19: 3823-8.
- Grum-Schwensen B, Klingelhöfer J, Grigorian M, Almholt K, Nielsen BS, Lukanidin E, Ambartsumian N, 2010. Lung metastasis fails in MMTV-PyMT oncomice lacking S100A4 due to a T-cell deficiency in primary tumors. *Cancer Res*, 70: 936-47.
- Guise TA, Kozlow WM, Heras-Herzig A, Padalecki SS, Yin JJ, Chirgwin JM, 2005. Molecular mechanisms of breast cancer metastases to bone. *Clin Breast Cancer*, 5: S46-53.
- Gupta GP, Minn AJ, Kang Y, Siegel PM, Serganova I, Cordon-Cardo C, Olshen AB, Gerald WL, Massagué J, 2005. Identifying site-specific metastasis genes and functions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 70: 149-58.
- Hajra KM, Fearon ER, 2002. Cadherin and catenin alterations in human cancers. *Genes Chromosomes Cancer*, 34: 255-268.
- Hartwell KA, Muir B, Reinhardt F, Carpenter AE, Sgroi DC, Weinberg RA, 2006. The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 18969-74.
- Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, Klein WH, 1993. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature*, 364: 501-6.
- Henning G, Löwrich O, Birchmeier W, Behrens J, 1996. Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression. *J Biol Chem*, 271: 595-602.

- Hennings H, Yuspa SH, 1985. Two-stage tumor promotion in mouse skin: an alternative interpretation. *J Natl Cancer Inst*, 74: 735-40.
- Hergueta-Redondo M, Palacios J, Cano A, Moreno-Bueno G, 2008. "New" molecular taxonomy in breast cancer. *Clin Transl Oncol*, 10: 777-85.
- Herranz N, Pasini D, Díaz VM, Francí C, Gutierrez A, Dave N, Escrivà M, Hernandez-Muñoz I, Di Croce L, Helin K, García de Herreros A, Peiró S, 2008. Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor. *Mol Cell Biol*, 28: 4772-81.
- Herranz N, Dave N, Millanes-Romero A, Morey L, Díaz VM, Lórenz-Fonfría V, Gutierrez-Gallego R, Jerónimo C, Di Croce L, García de Herreros A, Peiró S, 2012. Lysyl Oxidase-like 2 Deaminates Lysine 4 in Histone H3. *Mol Cell*, 46: 369-76.
- Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M, 2002. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell*, 2: 289-300.
- Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y, 2006. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol*, 8: 1369-75.
- Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, Akashi-Takamura S, Ishibashi S, Miyake K, Shibuya M, Akira S, Aburatani H, Maru Y, 2008. The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat Cell Biol*, 10: 1349-55.
- Hollosi P, Yakushiji JK, Fong KS, Csiszar K, Fong SF, 2009. Lysyl oxidase-like 2 promotes migration in noninvasive breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *Int J Cancer*, 125: 318-27.
- Holtmeier C, Görögh T, Beier U, Meyer J, Hoffmann M, Gottschlich S, Heidorn K, Ambrosch P, Maune S, 2003. Overexpression of a novel lysyl oxidase-like gene in human head and neck squamous cell carcinomas. *Anticancer Res*, 23: 2585-91.
- Hsu LY, Lauring J, Liang HE, Greenbaum S, Cado D, Zhuang Y, Schlissel MS, 2003. A conserved transcriptional enhancer regulates RAG gene expression in developing B cells. *Immunity*, 19: 105-17.

- Huang Z, Nie L, Xu M, Sun XH, 2004. Notch-induced E2A degradation requires CHIP and Hsc70 as novel facilitators of ubiquitination. *Mol Cell Biol*, 24: 8951-62.
- Ikawa T, Kawamoto H, Goldrath AW, Murre C, 2006. E proteins and Notch signaling cooperate to promote T cell lineage specification and commitment. *J Exp Med*, 203: 1329-42.
- Ito M, Liu Y, Yang Z, Nguyen J, Liang F, Morris RJ, Cotsarelis G, 2005. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med*, 11: 1351-4.
- Jaks V, Barker N, Kasper M, van Es JH, Snippert HJ, Clevers H, Toftgård R, 2008. Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nat Genet*, 40: 1291-9.
- Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J, Ratajczak MZ, 2005. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer*, 113: 752-60.
- Janowska-Wieczorek A, Marquez-Curtis LA, Wysoczynski M, Ratajczak MZ, 2006. Enhancing effect of platelet-derived microvesicles on the invasive potential of breast cancer cells. *Transfusion*, 46: 1199-209.
- de Jong OG, Verhaar MC, Chen Y, Vader P, Gremmels H, Posthuma G, Schiffelers RM, Gucek M, van Balkom BWM, 2012. Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *Journal of Extracellular Vesicles* 2012, 1: 18396.
- Jones S, 2004. An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol*, 5: 226.
- Jung T, Castellana D, Klingbeil P, Cuesta Hernández I, Vitacolonna M, Orlicky DJ, Roffler SR, Brodt P, Zöller M, 2009. CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes. *Neoplasia*, 11: 1093-105.
- Kalluri R, Neilson EG, 2003. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*, 112: 1776-84.
- Kaneda A, Wakazono K, Tsukamoto T, Watanabe N, Yagi Y, Tatematsu M, Kaminishi M, Sugimura T, Ushijima T, 2004. Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by

- methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers. *Cancer Res*, 64: 6410-5.
- Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordón-Cardo C, Guise TA, Massagué J, 2003. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*, 3: 537-49.
 - Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D, 2005. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438: 820-7.
 - Kaplan RN, Rafii S, Lyden D, 2006. Preparing the “soil”: the premetastatic niche. *Cancer Res*. 66: 110899-93.
 - Kee BL, Murre C, 1998. Induction of early B cell factor (EBF) and multiple B lineage genes by the basic helix-loop-helix transcription factor E12. *J Exp Med*, 188: 699-713.
 - Kee BL, 2009. E and ID proteins branch out. *Nat Rev Immunol*, 9: 175-84.
 - Kelly-Spratt KS, Gurley KE, Yasui Y, Kemp CJ, 2004. p19Arf suppresses growth, progression, and metastasis of Hras-driven carcinomas through p53-dependent and -independent pathways. *PLoS Biol*, 2:E242.
 - Kemp CJ, Donehower LA, Bradley A, Balmain A, 1993. Reduction of p53 gene dosage does not increase initiation or promotion but enhances malignant progression of chemically induced skin tumors. *Cell*, 74: 813-22.
 - Khakoo A, Thomas R, Trompeter R, Duffy P, Price R, Pope FM, 1997. Congenital cutis laxa and lysyl oxidase deficiency. *Clin Genet*, 51: 109-14.
 - Kim Y, Boyd CD, Csiszar K, 1995. A new gene with sequence and structural similarity to the gene encoding human lysyl oxidase. *J Biol Chem*, 270: 7176-82.
 - Kim Y, Peyrol S, So CK, Boyd CD, Csiszar K, 1999. Coexpression of the lysyl oxidase-like gene (LOXL) and the gene encoding type III procollagen in induced liver fibrosis. *J Cell Biochem*, 72: 181-8.

- Kim Y, Roh S, Park JY, Kim Y, Cho DH, Kim JC, 2009. Differential expression of the LOX family genes in human colorectal adenocarcinomas. *Oncol Rep*, 22:799-804.
- Kirschmann DA, Seftor EA, Nieva DR, Mariano EA, Hendrix MJ, 1999. Differentially expressed genes associated with the metastatic phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 55: 127-36.
- Kirschmann DA, Seftor EA, Fong SF, Nieva DR, Sullivan CM, Edwards EM, Sommer P, Csiszar K, Hendrix MJ, 2002. A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. *Cancer Res* 62: 4478-83.
- Kondo M, Cubillo E, Tobiume K, Shirakihara T, Fukuda N, Suzuki H, Shimizu K, Takehara K, Cano A, Saitoh M, Miyazono K, 2004. A role for Id in the regulation of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cell Death Differ*. 11: 1092-101.
- Korpai M, Yan J, Lu X, Xu S, Lerit DA, Kang Y, 2009. Imaging transforming growth factor-beta signaling dynamics and therapeutic response in breast cancer bone metastasis. *Nat Med*, 15: 960-6.
- Krishnamachary B, Zagzag D, Nagasawa H, Rainey K, Okuyama H, Baek JH, Semenza GL, 2006. Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFH1A, and ZFH1B. *Cancer Res*, 92: 840-7.
- Langer EM, Feng Y, Zhaoyuan H, Rauscher FJ 3rd, Kroll KL, Longmore GD, 2008. Ajuba LIM proteins are snail/slug corepressors required for neural crest development in *Xenopus*. *Dev Cell*, 14: 424-36.
- Larcher F, Bauluz C, Díaz-Guerra M, Quintanilla M, Conti CJ, Ballestín C, Jorcano JL, 1992. Aberrant expression of the simple epithelial type II keratin 8 by mouse skin carcinomas but not papillomas. *Mol Carcinog*, 6: 112-21.
- Lassar AB, Buskin JN, Lockshon D, Davis RL, Apone S, Hauschka SD, Weintraub H, 1989. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell*, 58: 823-31.
- Lazorchak AS, Wojciechowski J, Dai M, Zhuang Y, 2006. E2A promotes the survival of precursor and mature B lymphocytes. *J Immunol*, 177: 2495-504.

- Lemerrier C, To RQ, Carrasco RA, Konieczny SF, 1998. The basic helix-loop-helix transcription factor Mist1 functions as a transcriptional repressor of myoD. *EMBO J.* 17: 1412-22.
- Levy V, Lindon C, Zheng Y, Harfe BD, Morgan BA, 2007. Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. *FASEB J*, 21: 1358-66.
- Li H, Gerald WL, Benezra R, 2004. Utilization of bone marrow-derived endothelial cell precursors in spontaneous prostate tumors varies with tumor grade. *Cancer Res*, 64: 6137-43.
- Lin T, Ponn A, Hu X, Law BK, Lu J, 2010. Requirement of the histone demethylase LSD1 in Snai1-mediated transcriptional repression during epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*, 29: 4896-904.
- Liu X, Zhao Y, Gao J, Pawlyk B, Starcher B, Spencer JA, Yanagisawa H, Zuo J, Li T, 2004. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet*, 36:178-82.
- López KM, Greenaway FT, 2011. Identification of the copper-binding ligands of lysyl oxidase. *J Neural Transm*, 118: 1101-9.
- Lucero HA, Kagan HM, 2006. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci.* 63: 2304-16.
- Lugassy J, Zaffryar-Eilot S, Soueid S, Mordoviz A, Smith V, Kessler O, Neufeld G, 2012. The enzymatic activity of lysyl oxidase-like-2 (LOXL2) is not required for LOXL2-induced inhibition of keratinocyte differentiation. *J Biol Chem*, 287: 3541-9.
- Lyden D, Young AZ, Zagzag D, Yan W, Gerald W, O'Reilly R, Bader BL, Hynes RO, Zhuang Y, Manova K, Benezra R, 1999. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature*, 401: 670-7.
- Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S, 2001. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med*, 7: 1194-201.

- Ma L, Teruya-Feldstein J and Weinberg RA, 2007. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 449: 682–8.
- Ma Q, Kintner C and Anderson DJ, 1996. Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell*, 87: 43-52.
- Mäki JM, Kivirikko KI, 2001. Cloning and characterization of a fourth human lysyl oxidase isoenzyme. *Biochem J.* 355: 381-7.
- Mäki JM, Räsänen J, Tikkanen H, Sormunen R, Mälikallio K, Kivirikko KI, Soininen R, 2002. Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice. *Circulation*, 106:2503-9.
- Malanchi I, Peinado H, Kassen D, Hussenet T, Metzger D, Chambon P, Huber M, Hohl D, Cano A, Birchmeier W, Huelsken J, 2008. Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature*, 452: 650-3.
- Mani SA, Yang J, Brooks M, Schwaninger G, Zhou A, Miura N, Kutok JL, Hartwell K, Richardson AL, Weinberg RA, 2007. Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 10069-74.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F, 2008. Cancer-related inflammation. *Nature*, 454: 436-44.
- Markus M, Du Z, Benezra R, 2002. Enhancer-specific modulation of E protein activity. *J Biol Chem*, 277: 6469-77.
- Martínez-Estrada OM, Cullerés A, Soriano FX, Peinado H, Bolós V, Martínez FO, Reina M, Cano A, Fabre M, Vilaró S, 2006. The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem J*, 394: 449-57.
- Massari ME, Jennings PA, Murre C., 1996. The AD1 transactivation domain of E2A contains a highly conserved helix which is required for its activity in both *Saccharomyces cerevisiae* and mammalian cells. *Mol Cell Biol.*16: 121-9.
- Massari ME, Murre C. 2000. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol.* 20: 429-40.

- Matei I, Ghajar CM, Lyden D, 2011. A TeNaCious foundation for the metastatic niche. *Cancer Cell*, 20: 139-41.
- Mazieres J, You L, He B, Xu Z, Lee AY, Mikami I, McCormick F, Jablons DM, 2005. Inhibition of Wnt16 in human acute lymphoblastoid leukemia cells containing the t(1;19) translocation induces apoptosis. *Oncogene*, 24: 5396-400.
- Molina-Ortiz P., 2010. Caracterización funcional de Snail2 como represor de *cadherina-E* y como regulador del proceso de carcinogénesis química. Tesis Doctoral, UAM.
- Molina-Ortiz P, Villarejo A, MacPherson M, Santos V, Montes A, Souchelnytskyi S, Portillo F, Cano A, 2012. Characterization of the SNAG and SLUG Domains of Snail2 in the Repression of E-Cadherin and EMT Induction: Modulation by Serine 4 Phosphorylation. *PLoS One*, 7: e36132.
- Molnar J, Fong KS, He QP, Hayashi K, Kim Y, Fong SF, Fogelgren B, Szauter KM, Mink M, Csiszar K, 2003. Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1647: 220-24.
- Moreno-Bueno G, Cubillo E, Sarrió D, Peinado H, Rodríguez-Pinilla SM, Villa S, Bolós V, Jordá M, Fabra A, Portillo F, Palacios J, Cano A, 2006. Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*, 66: 9543-56.
- Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A, 2008. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene*, 27: 6958-69.
- Moreno-Bueno G, Peinado H, Molina P, Olmeda D, Cubillo E, Santos V, Palacios J, Portillo F, Cano A, 2009. The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Protoc*, 4: 1591-613.
- Moreno-Bueno G, Salvador F, Martín A, Floristán A, Cuevas EP, Santos V, Montes A, Morales S, Castilla MA, Rojo-Sebastián A, Martínez A, Hardisson D, Csiszar K, Portillo F, Peinado H, Palacios J, Cano A, 2011. Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), a new regulator of cell polarity required for metastatic dissemination of basal-like breast carcinomas. *EMBO Mol Med*, 3: 528-44.

- Mundy GR., 2002. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, 2: 584-93.
- Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C, 2010. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci*, 123: 1603-11.
- Murre C, McCaw PS, Baltimore D, 1989. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell*, 56: 777-83.
- Murre C, 2005. Helix-loop-helix proteins and lymphocyte development. *Nat Immunol*, 6: 1079-86.
- Navarro P, Gómez M, Pizarro A, Gamallo C, Quintanilla M, Cano A, 1991. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J Cell Biol*, 115: 517-33.
- Nazarenko I, Rana S, Baumann A, McAlear J, Hellwig A, Trendelenburg M, Lochnit G, Preissner KT, Zöller M, 2010. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res*, 70: 1668-78.
- Nguyen DX, Massagué J, 2007. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet*, 8: 341-52.
- Nguyen DX, Bos PD, Massagué J, 2009. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*, 9: 274-84.
- Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, Hui CC, Clevers H, Dotto GP, Radtke F, 2003. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet*, 33: 416-421.
- Nie L, Xu M, Vladimirova A, Sun XH, 2003. Notch-induced E2A ubiquitination and degradation are controlled by MAP kinase activities. *EMBO J*, 22: 5780-92.
- Nieto MA. The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease, 2011. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27: 347-76.

- Nieto MA and Cano A, 2012. The epithelial-mesenchymal transition under control: Global programs to regulate epithelial plasticity. *Semin Cancer Biol.* 2012 May 18. [Epub ahead of print].
- Nischt R, Roop DR, Mehrel T, Yuspa SH, Rentrop M, Winter H, Schweizer J, 1988. Aberrant expression during two-stage mouse skin carcinogenesis of a type I 47-kDa keratin, K13, normally associated with terminal differentiation of internal stratified epithelia. *Mol Carcinog*, 1: 96-108.
- Nishioka T, Eustace A, West C, 2012. Lysyl oxidase: from basic science to future cancer treatment. *Cell Struct Funct*, 37:75-80.
- Nutt SL, Kee BL, 2007. The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity*, 26: 715-25.
- Nygren MK, Døsen-Dahl G, Stubberud H, Wälchli S, Munthe E, Rian E, 2009. Beta-catenin is involved in N-cadherin-dependent adhesion, but not in canonical Wnt signaling in E2A-PBX1-positive B acute lymphoblastic leukemia cells. *Exp Hematol*, 37: 225-33.
- Offenberg H, Brünner N, Mansilla F, Orntoft Torben F, Birkenkamp-Demtroder K, 2008. TIMP-1 expression in human colorectal cancer is associated with TGF-B1, LOXL2, INHBA1, TNF-AIP6 and TIMP-2 transcript profiles. *Mol Oncol*, 2: 233-40.
- Ohyama M, 2006. Hair follicle bulge: a fascinating reservoir of epithelial stem cells. *J Dermatol Sci*, 46: 81-9.
- Ordentlich P, Lin A, Shen CP, Blaumueller C, Matsuno K, Artavanis-Tsakonas S, Kadesch T, 1998. Notch inhibition of E47 supports the existence of a novel signaling pathway. *Mol Cell Biol*, 18: 2230-9.
- Oskarsson T, Acharyya S, Zhang XH, Vanharanta S, Tavazoie SF, Morris PG, Downey RJ, Manova-Todorova K, Brogi E, Massagué J, 2011. Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat Med* 17: 867-74.
- Pan L, Hanrahan J, Li J, Hale LP, Zhuang Y, 2002. An analysis of T cell intrinsic roles of E2A by conditional gene disruption in the thymus. *J Immunol*, 168: 3923-32.

- Park BK, Zhang H, Zeng Q, Dai J, Keller ET, Giordano T, Gu K, Shah V, Pei L, Zarbo RJ, McCauley L, Shi S, Chen S, Wang CY, 2007. NF-kappaB in breast cancer cells promotes osteolytic bone metastasis by inducing osteoclastogenesis via GM-CSF. *Nat Med*,13: 62-9.
- Payne SL, Fogelgren B, Hess AR, Seftor EA, Wiley EL, Fong SF, Csiszar K, Hendrix MJ, Kirschmann DA, 2005. Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. *Cancer Res*, 65: 11429-36.
- Payne SL, Hendrix MJ, Kirschmann DA, 2007. Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer--a prospect. *J Cell Biochem*, 101: 1338-54.
- Peinado H, Portillo F, Cano A, 2004a. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol*. 48: 365-75.
- Peinado H, Marin F, Cubillo E, Stark HJ, Fusenig N, Nieto MA, Cano A, 2004b. Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J Cell Sci*. 117: 2827-39.
- Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A, 2004c. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol*. 24: 306-19.
- Peinado H, Del Carmen Iglesias-de la Cruz M, Olmeda D, Csiszar K, Fong KS, Vega S, Nieto MA, Cano A, Portillo F, 2005a. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J*. 24: 3446-58.
- Peinado H, Portillo F, Cano A, 2005b. Switching on-off Snail: LOXL2 versus GSK3beta. *Cell Cycle*. 4:1749-1752.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A, 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumor progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*, 7: 415-28.
- Peinado H, Moreno-Bueno G, Hardisson D, Pérez-Gómez E, Santos V, Mendiola M, de Diego JI, Nistal M, Quintanilla M, Portillo F, Cano A, 2008a. Lysyl oxidase-like 2 as a new poor prognosis marker of squamous cell carcinomas. *Cancer Res*. 68:4541-4550.

- Peinado H, Rafii S, Lyden D, 2008b. Inflammation joins the "niche". *Cancer Cell*, 14: 347-9.
- Peinado H, Lavotshkin S, Lyden D, 2011. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: Old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol*, 21: 139-46.
- Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, Matei I, Garcia-Santos G, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Garcia BA, Callahan MK, Martins VR, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D, 2012. Melanoma-derived exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through upregulation of the MET oncoprotein. *Nat Med*. 2012 May 27 [Epub ahead of print]
- Perez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, Dhondt G, Portillo F, Nieto MA, Cano A, 2001. A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem*. 276: 27424-31.
- Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E, 2003. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell*, 112: 535-48.
- Perk J, Iavarone A, Benezra R, 2005. Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*, 5: 603-14.
- Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G, 1998. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*, 392: 190-3.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D, 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406: 747-52.
- Pischon N, Mäki JM, Weisshaupt P, Heng N, Palamakumbura AH, N'Guessan P, Ding A, Radlanski R, Renz H, Bronckers TA, Myllyharju J, Kielbassa AM, Kleber BM, Bernimoulin JP, Trackman PC, 2009. Lysyl oxidase (lox) gene deficiency affects osteoblastic phenotype. *Calcif Tissue Int*, 85: 119-26.

- Polyak K, Weinberg RA, 2009. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*, 9: 265-73.
- Proweller A, Tu L, Lepore JJ, Cheng L, Lu MM, Seykora J, Millar SE, Pear WS, Parmacek MS, 2006. Impaired Notch signaling promotes de novo squamous cell carcinoma formation. *Cancer Res*, 66: 7438-44.
- Psaila B, Lyden D, 2009. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*, 9: 285-293.
- Puyol M, Martín A, Dubus P, Mulero F, Pizcueta P, Khan G, Guerra C, Santamaría D, Barbacid M, 2010. A synthetic lethal interaction between K-Ras oncogenes and Cdk4 unveils a therapeutic strategy for non-small cell lung carcinoma. *Cancer Cell*, 18: 63-73.
- Qiu Y, Sharma A, Stein R, 1998. p300 mediates transcriptional stimulation by the basic helix-loop-helix activators of the insulin gene. *Mol Cell Biol*, 18: 2957-64.
- Quaglini D, Fornieri C, Nanney LB, Davidson JM, 1993. Extracellular matrix modifications in rat tissues of different ages. Correlations between elastin and collagen type I mRNA expression and lysyl-oxidase activity. *Matrix*, 13: 481-90.
- Quintanilla M, Brown K, Ramsden M, Balmain A, 1986. Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature*, 322: 78-80.
- Rafii S, Lyden D, 2006. S100 chemokines mediate bookmarking of premetastatic niches. *Nat Cell Biol*. 8: 1321-3.
- Ren C, Yang G, Timme TL, Wheeler TM, Thompson TC, 1998. Reduced lysyl oxidase messenger RNA levels in experimental and human prostate cancer. *Cancer Res*, 58: 1285-90.
- Rodrigo I, Cato AC, Cano A, 1999. Regulation of E-cadherin gene expression during tumor progression: the role of a new Ets-binding site and the E-pal element. *Exp Cell Res*, 248: 358-71.
- Roop DR, Krieg TM, Mehrel T, Cheng CK, Yuspa SH, 1988. Transcriptional control of high molecular weight keratin gene expression in multistage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res*, 48: 3245-52.

- Rost T, Pyritz V, Rathcke IO, Görögh T, Dünne AA, Werner JA, 2003. Reduction of LOX- and LOXL2-mRNA expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Anticancer Res*, 23: 1565-73.
- Royce PM, Camakaris J, Danks DM, 1980. Reduced lysyl oxidase activity in skin fibroblasts from patients with Menkes' syndrome. *Biochem J*, 192: 579-86.
- Rückert F, Joensson P, Saeger HD, Grützmann R, Pilarsky C, 2010. Functional analysis of LOXL2 in pancreatic carcinoma. *Int J Colorectal Dis*, 25: 303-11.
- Ruggeri B, Caamano J, Goodrow T, DiRado M, Bianchi A, Trono D, Conti CJ, Klein-Szanto AJ, 1991. Alterations of the p53 tumor suppressor gene during mouse skin tumor progression. *Cancer Res*, 51: 6615-6621.
- Sakai M, Kato H, Sano A, Tanaka N, Inose T, Kimura H, Sohda M, Nakajima M, Kuwano H, 2009. Expression of lysyl oxidase is correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 16: 2494-501.
- Sarrió D, Rodríguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J, 2008. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res*, 68: 989-97.
- Scarlett CJ, Colvin EK, Pinese M, Chang DK, Morey AL, Musgrove EA, Pajic M, Apte M, Henshall SM, Sutherland RL, Kench JG, Biankin AV, 2011. Recruitment and activation of pancreatic stellate cells from the bone marrow in pancreatic cancer: a model of tumor-host interaction. *PLoS One*, 6: e26088.
- Schlissel M, Voronova A, Baltimore D, 1991. Helix-loop-helix transcription factor E47 activates germ-line immunoglobulin heavy-chain gene transcription and rearrangement in a pre-T-cell line. *Genes Dev*, 5: 1367-76.
- Sebban S, Davidson B, Reich R, 2009. Lysyl oxidase-like 4 is alternatively spliced in an anatomic site-specific manner in tumors involving the serosal cavities. *Virchows Arch*, 454: 71-9.
- Sethi N, Kang Y, 2011a. Unravelling the complexity of metastasis - molecular understanding and targeted therapies. *Nat Rev Cancer*, 11: 735-48.

- Sethi N, Kang Y., 2011b. Notch signalling in cancer progression and bone metastasis. *Br J Cancer*, 105: 1805-10.
- Shen CP, Kadesch T, 1995. B-cell-specific DNA binding by an E47 homodimer. *Mol Cell Biol*, 15: 4518-24.
- Shojaei F, Wu X, Malik AK, Zhong C, Baldwin ME, Schanz S, Fuh G, Gerber HP, Ferrara N, 2007. Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nat Biotechnol*, 25: 911-20.
- Shook D, Keller R, 2003. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev*, 120: 1351-1383.
- Sibon I, Sommer P, Lamaziere JM, Bonnet J, 2005. Lysyl oxidase deficiency: a new cause of human arterial dissection. *Heart*, 91: e33.
- Slattery C, McMorrow T, Ryan MP, 2006. Overexpression of E2A proteins induces epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells suggesting a potential role in renal fibrosis. *FEBS Lett*, 580: 4021-30.
- Slattery C, Ryan MP, McMorrow T, 2008. E2A proteins: regulators of cell phenotype in normal physiology and disease. *Int J Biochem Cell Bio*, 40: 1431-6.
- Sobrado VR, Moreno-Bueno G, Cubillo E, Holt LJ, Nieto MA, Portillo F, Cano A, 2009. The class I bHLH factors E2-2A and E2-2B regulate EMT. *J Cell Sci*. 122:1014-24.
- Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, Dimmler A, Bauer K, Sultan A, Hlubek F, Jung A, Strand D, Eger A, Kirchner T, Behrens J, Brabletz T, 2008. The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res*, 68: 537-44.
- Spano D, Zollo M, 2012. Tumor microenvironment: a main actor in the metastasis process. *Clin Exp Metastasis*, 29: 381-95.
- Stassar MJ, Devitt G, Brosius M, Rinnab L, Prang J, Schradin T, Simon J, Petersen S, Kopp-Schneider A, Zöller M, 2001. Identification of human renal cell carcinoma associated genes by suppression subtractive hybridization. *Br J Cancer*, 85: 1372-82.

- Steininger A, Möbs M, Ullmann R, Köchert K, Kreher S, Lamprecht B, Anagnostopoulos I, Hummel M, Richter J, Beyer M, Janz M, Klemke CD, Stein H, Dörken B, Sterry W, Schrock E, Mathas S, Assaf C, 2011. Genomic loss of the putative tumor suppressor gene E2A in human lymphoma. *J Exp Med*, 208: 1585-93.
- Stenbäck F, 1980. Skin carcinogenesis as a model system: observations on species, strain and tissue sensitivity to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene with or without promotion from croton oil. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 46:89-97.
- Szauter KM, Cao T, Boyd CD, Csiszar K, 2005. Lysyl oxidase in development, aging and pathologies of the skin. *Pathol Biol (Paris)*. 53: 448-56.
- Takeichi M, 1993. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol*, 5: 806-11.
- Talora C, Cialfi S, Segatto O, Morrone S, Kim Choi J, Frati L, Paolo Dotto G, Gulino A, Screpanti I, 2005. Constitutively active Notch1 induces growth arrest of HPV-positive cervical cancer cells via separate signaling pathways. *Exp Cell Res*, 305: 343-54.
- Tennenbaum T, Yuspa SH, Grover A, Castronovo V, Sobel ME, Yamada Y, De Luca LM, 1992. Extracellular matrix receptors and mouse skin carcinogenesis: altered expression linked to appearance of early markers of tumor progression. *Cancer Res*, 52: 2966-76.
- Thiery JP, 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nat Rev Cancer*, 2: 442-54.
- Thiery JP, Sleeman JP, 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7: 131-42.
- Thiery JP, Acloque H, Huang R and Nieto MA, 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139: 871-90.
- Vadasz Z, Kessler O, Akiri G, Gengrinovitch S, Kagan HM, Baruch Y, Izhak OB, Neufeld G, 2005. Abnormal deposition of collagen around hepatocytes in Wilson's disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2. *J Hepatol*, 43: 499-507.

- Vasioukhin V, Degenstein L, Wise B, Fuchs E, 1999. The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 8551-6.
- Voronova A, Baltimore D, 1990. Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 4722-26.
- Wang J, Hoshino T, Redner RL, Kajigaya S, Liu JM, 1998. ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 10860-5.
- Wang X, Zheng M, Liu G, Xia W, McKeown-Longo PJ, Hung MC, Zhao J, 2007. Krüppel-like factor 8 induces epithelial to mesenchymal transition and epithelial cell invasion. *Cancer Res*, 67: 7184-93.
- Watt FM, Lo Celso C, Silva-Vargas V, 2006. Epidermal stem cells: an update. *Curr Opin Genet Dev*, 16: 518-24.
- Watt FM, Estrach S, Ambler CA, 2008. Epidermal Notch signalling: differentiation, cancer and adhesion. *Curr Opin Cell Biol*, 20: 171-9.
- Weintraub H, Dwarki VJ, Verma I et al., 1991. Muscle-specific transcriptional activation by MyoD. *Genes Dev*, 5: 1377-86.
- Wels J, Kaplan RN, Rafii S, Lyden D, 2010. Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes Dev*, 22: 559-74.
- Willis BC, duBois RM, Borok Z, 2006. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc Am Thorac Soc*, 3: 377-82.
- Wong CC, Gilkes DM, Zhang H, Chen J, Wei H, Chaturvedi P, Fraley SI, Wong CM, Khoo US, Ng IO, Wirtz D, Semenza GL, 2011. Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 108: 16369-74.
- Wong CC, Zhang H, Gilkes DM, Chen J, Wei H, Chaturvedi P, Hubbi ME, Semenza GL, 2012. Inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 block breast cancer metastatic niche formation and lung metastasis. *J Mol Med (Berl)*. 2012 Jan 10. [Epub ahead of print].

- Woodcroft M, 2009. Tcf2a: Mus musculus transcription factor 3. Transcription Factor Encyclopedia, A worldwide collaboration of transcription factor experts.
- Xiang X, Poliakov A, Liu C, Liu Y, Deng ZB, Wang J, Cheng Z, Shah SV, Wang GJ, Zhang L, Grizzle WE, Mobley J, Zhang HG, 2009. Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. *Int J Cancer*, 124: 2621-33.
- Yan W, Young AZ, Soares VC, Kelley R, Benezra R and Zhuang Y, 1997. High incidence of T-cell tumors in E2A-null mice and E2A/Id1 double-knockout mice. *Mol Cell Biol*, 17: 7317-27.
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA, 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 117:927-39.
- Yang L and Moses HL, 2008. Transforming growth factor beta: tumor suppressor or promoter? Are host immune cells the answer? *Cancer Res*, 68: 9107-11.
- Yang MH, Hsu DS, Wang HW, Wang HJ, Lan HY, Yang WH, Huang CH, Kao SY, Tzeng CH, Tai SK, Chang SY, Lee OK, Wu KJ, 2010. Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*, 12: 982-92.
- Yang Q, Kardava L, St Leger A, Martincic K, Varnum-Finney B, Bernstein ID, Milcarek C, Borghesi L, 2008. E47 controls the developmental integrity and cell cycle quiescence of multipotential hematopoietic progenitors. *J Immunol*, 181: 5885-94.
- Ye XZ, Yu SC, Bian XW, 2010. Contribution of myeloid-derived suppressor cells to tumor-induced immune suppression, angiogenesis, invasion and metastasis. *J Genet Genomics*, 37: 423-30.
- Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massagué J, Mundy GR, Guise TA, 1999. TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest*, 103: 197-206.
- Yuspa SH, Długosz AA, Cheng CK, Denning MF, Tennenbaum T, Glick AB, Weinberg WC, 1994. Role of oncogenes and tumor suppressor genes in multistage carcinogenesis. *J Invest Dermatol*, 103: 90S-95S.

- Yuspa SH, Dlugosz AA, Denning MF, Glick AB, 1996. Multistage carcinogenesis in the skin. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 1: 147-150.
- Zeisberg M, Kalluri R, 2004. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med*, 82: 175-81.
- Zhang Y, Babin J, Feldhaus AL, Singh H, Sharp PA, Bina M, 1991. HTF4: a new human hélix-loop-helix protein. *Nucleic Acids Res*, 19: 598-606
- Zhang J, Kalkum M, Yamamura S, Chait BT, Roeder RG, 2004. E protein silencing by the leukemogenic AML1-ETO fusion protein. *Science*, 305: 1286-9.
- Zheng L, Baumann U, Reymond JL, 2004. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res*, 32: e115.
- Zhuang Y, Soriano P, Weintraub H, 1994. The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell*, 79: 875-84.
- Zhuang Y, Jackson A, Pan L, Shen K, Dai M, 2004. Regulation of E2A gene expression in B-lymphocyte development. *Mol Immunol*, 40: 1165-77.
- de Zoeten E, Carr-Brendel V, Markovic D, Taylor-Papadimitriou J, Cohen EP, 1999. Treatment of breast cancer with fibroblasts transfected with DNA from breast cancer cells. *J Immunol*, 162: 6934-41.
- Zou W, 2005. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*, 5: 263-74.